

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**Graduate School in Pharmacological Sciences / Scuola di Dottorato in
Scienze Farmacologiche**

Dipartimento di Scienze Farmacologiche

Dottorato di Ricerca in Scienze Farmacotossicologiche, Farmacognostiche e
Biotecnologie Farmacologiche

Ciclo XXIV

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**New evidences of two different key pathogenic mechanisms in
Huntington's Disease**

Settore Scientifico Disciplinare: BIO14

Dott.ssa. Manuela Marullo

TUTOR
Prof. Elena Cattaneo

COORDINATORE DEL DOTTORATO:
Prof. Guido Franceschini

A.A.
2010-2011

INDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUZIONE | 4 |
| La Malattia di Huntington | 4 |
| Il gene malattia | 4 |
| Epidemiologia | 5 |
| Sintomatologia | 6 |
| Neuropatologia | 6 |
| Meccanismi molecolari alla base della Malattia di Huntington..... | 7 |
| Gain of function | 7 |
| Funzioni dell'huntingtina sana | 13 |
| Il BDNF nella malattia di Huntington..... | 16 |
| Il gene del BDNF umano | 17 |
| Sintesi e secrezione del BDNF | 18 |
| Trasporto anterogrado e retrogrado del BDNF | 19 |
| Il BDNF e la sinapsi cortico-striatale..... | 20 |
| Riduzione della trascrizione del BDNF nella Malattia di Huntington..... | 20 |
| Alterazione del trasporto del BDNF | 22 |
| Influenza della perdita del BDNF nella malattia di Huntington | 23 |
| Strategie per ripristinare i livelli di BDNF | 24 |
| Il BDNF come potenziale marcatore di patologia | 25 |
| COLESTEROLO nel cervello: LINK con HD | 29 |
| Il colesterolo nel sistema nervoso centrale..... | 29 |
| Il colesterolo nelle malattie neurodegenerative: Sindrome di Smith-Lemli-Opitz e Malattia di Alzheimer | 30 |
| Regolazione dei livelli di colesterolo nel cervello | 31 |
| Alterazione della biosintesi di colesterolo nella Malattia di Huntington | 31 |
| Componenti cellulari coinvolti nella biosintesi del Colesterolo nel cervello | 33 |
| Il cross-talk Astrociti – Neuroni nella malattia di Huntington..... | 34 |
| | |
| Parte I: Marcatori periferici di malattia: Il caso del BDNF nel paziente Huntington e lo sviluppo di nuove strategie per la sua detezione | 36 |
| | |
| SCOPO | 38 |
| RISULTATI..... | 39 |
| Analisi del BDNF Proteina nei pazienti HD | 39 |
| Misure dei livelli di BDNF proteina nel plasma dei pazienti HD..... | 39 |
| Misure dei livelli di BDNF proteina nel siero dei pazienti HD | 40 |
| Quantificazione dei livelli di BDNF messaggero nei pazienti HD | 41 |
| Variabilità dei livelli di BDNF nel sangue umano: il problema dei "Reference genes" | 41 |
| Individuazione di una nuova strategia di normalizzazione per le analisi in Real Time PCR: le <i>EAR repeats</i> | 42 |

| | |
|--|----|
| Validazione delle sequenze EAR come metodo accurate di normalizzazione per analisi di qPCR nel sangue umano..... | 44 |
| Applicazione del metodo di normalizzazione delle EAR in altri tessuti umani | 45 |
| Quantificazione del BDNF messaggero nel sangue umano | 46 |
| Validazione di RNA messaggeri precedentemente individuati come biomarker in HD | 46 |
| DISCUSSIONE..... | 48 |
| CONCLUSIONI | 55 |

Parte II: Disfunzione del colesterolo nella Malattia di Huntington: ruolo degli astrociti..... 57

| | |
|--|----|
| SCOPO..... | 58 |
| RISULTATI..... | 59 |
| Contributo degli astrociti esprimenti l'huntingtina mutata alla ridotta biosintesi di colesterolo nell'HD. | 59 |
| Valutazione della ridotta biosintesi e secrezione del colesterolo negli Astrociti primari derivati dal topo R6/2. | 59 |
| Valutazione della ridotta biosintesi e secrezione del colesterolo negli astrociti derivati da cellule staminali neurali (NS) | 60 |
| Influenza di meccanismi cellulari non autonomi sulle proprietà neuronali colesterolo-dipendenti. | 60 |
| Crescita neuritica in neuroni derivati da NS..... | 60 |
| Influenza del colesterolo sulla crescita neuritica..... | 61 |
| Influenza del colesterolo proveniente dagli astrociti sulla crescita neuritica..... | 62 |
| "De-lipoproteinizzazione" del GCM _{WT} ed effetto sulla crescita neuritica | 62 |
| Effetto dell'ApoE-colesterolo sull'attività' sinaptica | 63 |
| Meccanismi molecolari alla base della disfunzione del colesterolo negli astrociti HD | 64 |
| Modulazione dell'attività di SREBP negli astrociti ed effetto sulla crescita neuronale | 64 |
| DISCUSSIONE..... | 67 |
| CONCLUSIONI | 72 |
| MATERIALI E METODI | 73 |
| Studio Sperimentale | 73 |
| Criteri di reclutamento di pazienti e controlli | 73 |
| Prelievo dei campioni di sangue e processamento | 74 |
| BDNF ELISA | 75 |
| Estrazione dell'RNA | 75 |
| Retrotrascrizione dell'RNA | 76 |
| PCR Qualitativa..... | 76 |
| Real-time PCR | 76 |
| Culture cellulari | 77 |
| Differenziamento neuronale in vitro | 77 |
| Differenziamento astrocitario in vitro | 78 |
| Culture Primarie..... | 78 |
| Saggi di modulazione di SREBP2 RNA interferente | 79 |

| | |
|--|-----|
| Analisi di Immunocitochimica | 79 |
| SDS-PAGE e Western Blot | 80 |
| Elettrofisiologia | 80 |
| Analisi statistica e rappresentazione dei dati | 81 |
| BIBLIOGRAFIA | 82 |
| FIGURE E TABELLE | 95 |
| MANOSCRITTI ORIGINALI..... | 122 |

INTRODUZIONE

LA MALATTIA DI HUNTINGTON

La Corea di Huntington è una devastante patologia neurodegenerativa a trasmissione autosomica dominante che si manifesta nella popolazione mondiale con un'incidenza di 4-7 casi ogni 100.000 individui.

Il nome di questa malattia deriva dal suo originario descrittore, il medico inglese George Huntington, che fu il primo a descriverla nel 1872 come una *chorea*, termine greco che indica una danza, per i movimenti involontari degli arti, del viso, del collo e del tronco che si manifestano all'insorgere della malattia.

George Huntington fece una classica descrizione della malattia in tre paragrafi, pubblicati dal *Medical and Surgical Reporter* di Philadelphia sottolineando un carattere ereditario della malattia, una tendenza all'infermità mentale e una grave manifestazione sintomatica in età adulta. Tuttavia, Huntington non riuscì a trovare una causa ai sintomi da lui osservati, nonostante trascorse gran parte della sua vita a studiare questa specifica malattia, ma diede un importante contributo per definire malati, persone che fino ad allora erano scambiate per indemoniate.

Ci volle più di un secolo per trovare un'ipotetica causa della Malattia di Huntington. Un punto fondamentale nella ricerca su questa patologia fu raggiunto nel 1981, quando Dott.ssa Nancy Wexler e i suoi collaboratori identificarono un marker genetico per l'Huntington grazie ad uno studio sul sangue proveniente da individui malati provenienti dalla regione del lago Maracaibo in Venezuela, dove è presente ad oggi la comunità con il maggior numero di individui affetti da HD (più di 18000 pazienti distribuiti in 10 generazioni). Due anni dopo, nel 1983, Gusella, Wexler, Conneally e collaboratori hanno identificato un marcatore polimorfico sul cromosoma 4 umano probabilmente legato all'Huntington (Gusella et al., 1983), e finalmente 10 anni dopo, grazie al contributo di 58 ricercatori, fu scoperto il gene responsabile della Malattia di Huntington (HDCRG, 1993).

Il gene malattia

Il gene identificato è chiamato IT15, mappa sul braccio corto del cromosoma 4, a livello della regione p.16.3, si estende per circa 180kb ed è costituito da 67 esoni dalle dimensioni variabili comprese tra le 48 e le 341 paia di basi.

Al terminale 5' del gene, nel primo esone e circa 370 nucleotidi a valle del sito ATG d'inizio della trascrizione, si trova una sequenza trinucleotidica ripetuta CAG codificante per l'amminoacido glutammina. Questa ripetizione costituisce un sito polimorfico nella

popolazione, in quanto il numero delle ripetizioni è variabile da individuo ad individuo. Tuttavia quando il numero di ripetizioni supera un valore soglia si osserva la malattia. La trasmissione è dominante quindi basta un allele mutato per avere l'insorgenza della patologia. Nello specifico, mentre nella popolazione sana il numero di CAG è sempre compreso tra le 9 e le 35 unità, nei soggetti malati la sequenza risulta espansa con un numero superiore alle 36 ripetizioni fino ad un massimo osservato di 250 (Duyao et al., 1993; Snell et al., 1993; Andrew 1993) (Figura 1).

Tali osservazioni permettono di affermare che causa della malattia è l'aumento del numero di ripetizioni di triplette CAG che a livello traduzionale si riflette in una proteina dotata di un tratto poliglutamminico più lungo (Poly-Q) rispetto alla proteina sana. La Corea di Huntington appartiene quindi alla classe di patologie da tratto poliglutamminico espanso che comprende le Atassie Spinocerebellari (SCA) di tipo 1, 2, 3, 6, 7 e 17, l'Atrofia Spinobulbare Muscolare (SBMA) e l'Atrofia Dentatorubralepallidoluisiana (DRPLA). Tali malattie sono caratterizzate dalla neurodegenerazione selettiva di una determinata area cerebrale, con conseguente neurodegenerazione specifica di una diversa popolazione neuronale. Questa evidenza suggerisce che la ripetizione della tripletta in se non è sufficiente a spiegare la morte selettiva neuronale, la cui causa è probabilmente da ricercare nella perdita di funzione delle proteine coinvolte (Cattaneo, 2001).

Ricerche su soggetti con numero di ripetizioni CAG compreso tra 36 e 40 hanno dimostrato la non assoluta penetranza della malattia, in quanto alcuni di questi individui non mostrano i sintomi tipici della patologia nemmeno in età avanzata e sono quindi definiti *border-line* (Albin & Tagle, 1995).

Pur essendo la corea di Huntington una malattia genetica autosomica dominante, esistono alcuni casi sporadici di patologia: essi sono attribuibili al fenomeno dell'anticipazione genetica (Ranen et al., 1995), ovvero all'espansione del tratto poliglutamminico che si verifica di generazione in generazione a causa dell'incremento delle triplette CAG a livello della linea germinale. Il fenomeno si sviluppa soprattutto se la mutazione è di origine paterna: infatti, l'analisi del genoma di padri di individui affetti dalla malattia ha evidenziato nel gene codificante per l'huntingtina la presenza di un numero di ripetizioni compreso tra 30 e 38, ovvero un numero superiore a quello riscontrabile nella maggior parte della popolazione sana, ma al di sotto della soglia patologica.

Epidemiologia

La malattia di Huntington si manifesta in ugual misura in individui di sesso maschile e femminile. La patologia insorge in diverse aree geografiche e differenti popolazioni mondiali, nelle diverse etnie può però variare la frequenza di comparsa della malattia. L'insorgenza della Corea di Huntington è stata stimata intorno a 4-10 individui su 100.000. E' meno presente nella popolazione Giapponese, Cinese, Filandese e Africana rispetto alle popolazioni dell'Europa occidentale. Negli U.S.A. la Malattia di Huntington si manifesta con un'insorgenza maggiore, manifestandosi in 10 individui su 100.000, con un totale di 25.000 mila persone affette. In Italia vi sono 4.000 persone malate e 15.000 individui a rischio malattia.

Sintomatologia

I sintomi della patologia di Huntington possono essere classificati in tre categorie principali: i disturbi motori, i disturbi della personalità e i disturbi di tipo cognitivo.

La principale manifestazione sintomatica è il disturbo motorio che prende il nome di corea (dal greco *chorea*: danza), ovvero una serie di convulsi movimenti involontari degli arti, del tronco, del viso e del collo che paiono simili ad una danza. I disordini motori comprendono, oltre alla corea, anche la distonia, cioè un insieme di rapidi movimenti dei muscoli prossimali del tronco. Si osserva, inoltre, una progressiva perdita della coordinazione fino ad arrivare allo stadio in cui ogni movimento volontario risulta impossibile. Questi fenomeni conducono a disartria, disfagia e perdita d'equilibrio.

A tali invalidanti sintomi neurologico-motori si aggiungono alterazioni comportamentali. Da test neuropsicologici condotti da Rosenberg e collaboratori su 33 individui affetti (Rosenberg et al., 1995), è emerso che il soggetto malato, dal punto di vista comportamentale, presenta perdita di iniziativa e di spontaneità, incapacità alla concentrazione e diminuita comunicatività, una capacità cognitiva significativamente ridotta comprendente memoria, attenzione, apprendimento e capacità di progettazione. I pazienti sono spesso descritti come impulsivi, irresponsabili, emotivi e con difficoltà ad organizzare la loro vita quotidiana (Martin & Gusella, 1986). In alcuni casi si possono sviluppare sintomi psicotici che ricordano la schizofrenia (Wellington et al., 1998).

L'insorgenza della malattia è variabile dalla prima decade di vita fino ad oltre i sessant'anni, ma in genere i sintomi compaiono intorno ai 35-40 anni e si aggravano progressivamente sino al sopraggiungere della morte, in media 15-20 anni dopo l'esordio del male, spesso per complicazioni infettive dovute all'immobilità forzata (Albin & Tagle, 1995).

Lo stadio di avanzamento della patologia è classificato in cinque gradi stabiliti in base a referti autoptici di individui affetti.

I casi definiti di grado 0 presentano una storia clinica e familiare che rende ipotizzabile la malattia, anche se non si riscontrano fenomeni neurodegenerativi a livello autoptico. Tutti i gradi successivi rivelano una progressiva riduzione della massa cerebrale, fino al 30% del peso complessivo, dovuta alla degenerazione di neuroni striatali e corticali, la cui entità è direttamente correlata alla durata e alla gravità della patologia. Il grado 4 è caratterizzato dalla perdita del 90% dei neuroni striatali, da astrocitosi e da grave atrofia (Reiner et al., 1988) (Figura 2).

Neuropatologia

Data l'evidente diminuzione della massa cerebrale, sono stati condotti numerosi studi anatomici per identificare ed analizzare quali fossero le aree dell'encefalo maggiormente colpite dalla neurodegenerazione: da tali analisi è emerso che la patologia determina una consistente perdita di cellule nervose nello striato, nella corteccia cerebrale, nel talamo, nel subtalomo e nell'ippocampo. La neurodegenerazione coinvolge maggiormente lo striato che appartiene al sistema dei nuclei della base insieme con il Nucleo Subtalamico, il Globo Pallido

e la Sostanza Nigra. Questa struttura è implicata nella regolazione di diverse funzioni motorie e cognitive (Myers et al., 1991; Vonsattel et al., 1985).

In particolare la popolazione neuronale striatale maggiormente colpita è quella dei neuroni medio spinosi (MSP) che proiettano al globo pallido (Ferrante et al., 1987). L'azione di tali neuroni è mediata dal neurotrasmettitore GABA (acido g-aminobutirrico) e in condizioni non patologiche queste cellule proiettano al globo pallido esterno con funzione inibitoria.

In condizioni patologiche, invece, la diminuzione di tali neuroni e conseguentemente la perdita della loro funzione inibitoria, determina un'anomala neurotrasmissione nei successivi passaggi comunicativi fra le regioni cerebrali, a partire dalla mancata inibizione dei neuroni bersaglio situati nel globo pallido. Questi ultimi sono anch'essi di tipo GABAergico e proiettano al nucleo subtalamico. La loro ridotta inibizione produce un aumento dei segnali eccitatori glutamatergici che dal globo pallido stesso partono verso la corteccia, provocando i tipici sintomi motori (Reiner et al., 1988; Albin et al., 1989).

Sebbene lo striato sia la regione maggiormente colpita da morte cellulare e atrofia nei malati di Huntington, il fenotipo clinico evidenzia una situazione più complessa che non può essere spiegata con la sola degenerazione striatale: studi neuropatologici hanno infatti evidenziato danni anche a livello di globo pallido, nucleo subtalamico, sostanza nera, talamo, cervelletto e corteccia cerebrale (Vonsattel and DiFiglia, 1998).

Studi recenti condotti da Rosas e collaboratori hanno identificato nei pazienti degenerazione diffusa di molte aree cerebrali a partire da stadi precoci della malattia (Rosas et al., 2003).

MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELLA MALATTIA DI HUNTINGTON

Gli innumerevoli studi condotti per determinare i meccanismi molecolari alla base della malattia di Huntington corroborano un'ipotesi patogenetica complessa e multifattoriale.

La dominanza genetica suggerisce l'ipotesi del "*gain of function*", secondo la quale la patologia è strettamente correlata a nuove funzioni tossiche che la proteina mutata acquisisce rispetto alla proteina sana in seguito all'espansione della tripletta CAG e quindi all'allungamento del tratto poliQ. Tuttavia, ciò che i ricercatori hanno scoperto riguardo ai ruoli tossici della proteina mutata non spiega completamente i sintomi della malattia ed in particolare la degenerazione selettiva dei neuroni dello striato. Le molteplici osservazioni riportate in letteratura e gli innovativi esperimenti effettuati hanno quindi portato alla nascita di un'alternativa linea di pensiero diverse ma compatibili, che prende in esame la perdita di funzioni fisiologiche dell'huntingtina sana. Studi recenti, tra cui quelli descritti in questa tesi di dottorato, sono quindi focalizzati alla comprensione del ruolo della proteina sana e alle funzioni fisiologiche alterate in seguito all'acquisizione della mutazione, suggerendo un'ipotesi alternativa, ma compatibile con il "*gain of function*", sulle cause della neurodegenerazione (Zuccato et al., 2010)

Gain of function

L'ipotesi che la Malattia di Huntington, patologia a trasmissione dominante, insorga in seguito all'acquisizione di un'attività tossica da parte dell'huntingtina mutata è alla base della teoria del *gain of function*.

La prima evidenza sperimentale di "*gain of function*", deriva dalla dimostrazione che la delezione di una estesa porzione del cromosoma 4, su cui mappa il gene malattia IT15, non causa la patologia (Cattaneo et al., 2001).

Altre evidenze sperimentali che sostengono questa tesi si basano su studi condotti in topi knock-out eterozigoti per l'huntingtina. In questi modelli animali non è stata osservata nessuna alterazione del fenotipo e questo ha portato ad escludere un coinvolgimento dell'huntingtina sana nella patologia (Duyao et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Inoltre, altre osservazioni condotte su pazienti Huntington eterozigoti ed omozigoti che non mostravano alcuna divergenza nella sintomatologia, ha contribuito ad indirizzare i ricercatori verso l'individuazione delle possibili funzioni tossiche acquisite dell'huntingtina mutata (Wexler et al., 1987; Durr et al., 1999).

Le funzioni tossiche che si considerano acquisite dalla forma mutata della huntingtina sono principalmente 5

1. Proteolisi dell'huntingtina mutata e formazione di aggregati
2. Disfunzioni mitocondriali
3. Interazione anormale con altre proteine
4. Eccitotossicità
5. Alterazione della trascrizione genica

1) Proteolisi dell'huntingtina mutata e formazione di aggregati

Un fenomeno che si verifica a livello cellulare nella Malattia di Huntington è la degradazione enzimatica dell'huntingtina mutata in frammenti più corti che, a differenza della proteina nella sua conformazione nativa, acquistano la capacità di migrare verso il nucleo. Si sospetta che tali frammenti siano coinvolti nella formazione di aggregati che sembrano ricoprire un ruolo tossico all'interno della cellula. Le proteine responsabili del taglio della proteina sono le caspasi, effettori finali nella cascata apoptotica. A conferma di questi dati è stato dimostrato che inibendo il sito catalitico della caspasi-3 con il tetrapeptide Ac-DEVD-CHO in colture di cellule umane, si verifica il blocco dell'apoptosi e della degradazione proteolitica dell'huntingtina (Goldberg et al., 1996; Wellington et al., 2000).

Sia la forma sana sia quella mutata della proteina risultano essere substrato della caspasi-3. Tuttavia i due casi differiscono in termini di cinetica di reazione. Frammenti di huntingtina sono presenti anche in cervelli di topi sani, suggerendo che il taglio proteolitico caspasi-mediato sia un evento fisiologico per la cellula. Tuttavia la proteina mutata sembra essere il substrato preferito dall'enzima dando luogo a processi con una cinetica di reazione molto più veloce nei confronti della corrispondente forma normale. Dal taglio si originano frammenti amino-terminali tossici per la cellula. È stato osservato che tali frammenti si accumulano preferenzialmente nel nucleo dei neuroni corticali, fornendo un'evidenza del coinvolgimento di questo processo nelle disfunzioni cortico-striatali (Wellington et al., 2000).

Kim e collaboratori hanno individuato nelle calpaine, cistein-proteasi calcio attivate, una classe di proteine che è a sua volta implicata nella degradazione dell'huntingtina sana e mutata. In particolare sembra che esse intervengano nell'ulteriore taglio dei frammenti già processati dalla caspasi-3, generando peptidi di dimensioni minori che possono formare aggregati (Kim et al., 2001).

I frammenti amino-terminali che si formano in seguito al taglio delle caspasi e delle calpaine, formano aggregati nucleari e citosolici, che hanno una morfologia fibrillare e sono SDS (Sodio Dodecil Solfato) resistenti. La presenza di aggregati osservata in parecchi tipi di cellule trasfettate con huntingtina mutata, appare essere legata a molti fattori, inclusi il tipo di cellula ed i livelli di espressione della proteina esogena. Inclusioni intranucleari sono state rivelate inoltre in topi transgenici per l'esone I dell'huntingtina mutata (Davies et al., 1997; Martindale et al., 1998). *In vitro* invece frammenti N-terminali contenenti il tratto poliglutaminico, derivati dal taglio proteolitico dell'huntingtina, formano aggregati e conferiscono una suscettibilità maggiore a stimoli apoptotici (Martingale et al., 1998).

Gli aggregati sono stati identificati in cellule PC12 di feocromocitoma trasfettate con vettori codificanti per frammenti amino-terminali dell'huntingtina mutata (Li et al., 1999). Lo stesso dato è stato confermato su altri sistemi cellulari e modelli animali, come nelle cellule di neuroblastoma N2a e in fibroblasti HEK293 (Cooper et al., 1998; Martingale et al., 1998), nei neuroni di topo R6/2 transgenici per l'huntingtina umana mutata (Davies et al., 1997; Martingale 1998), nei neuroni di tipo YAC46 e YAC72 esprimenti l'huntingtina umana mutata rispettivamente con 46 e 72 ripetizioni della tripletta CAG (Hodgson et al., 1999) e anche in cervelli di pazienti *post-mortem* (DiFiglia et al., 1997).

Tuttavia in seguito ad esperimenti di trasfezione di huntingtina mutata in colture di neuroni striatali, Saudou ha concluso che gli aggregati nucleari di huntingtina non sono sufficienti per spiegare la neurodegenerazione e che, sorprendentemente, la loro formazione non è correlata a tossicità. Piuttosto, la morte cellulare è accentuata dai fattori che eliminano gli aggregati stessi. L'autore suggerisce che questi siano protettivi e possano costituire una strategia per diminuire la tossicità dell'huntingtina mutata (Saudou et al., 1998).

In presenza degli aggregati, la cellula reagisce con i suoi consueti meccanismi di difesa: fra questi c'è l'azione delle *chaperones*, proteine appartenenti alla classe delle *Heat shock protein* (HSP) che sono attratte dagli aggregati e cercano di disgregarli per riportare le proteine nella loro corretta conformazione (Kim et al., 2002). Le proteine che non vengono riportate al loro corretto *fold*ing, vengono poli-ubiquitinate e indirizzate verso il proteasoma per essere degradate. Tuttavia il lavoro di Bence e collaboratori ha evidenziato come la presenza degli aggregati inibisce la funzionalità del proteasoma, lasciando in circolo proteine non funzionalmente corrette e potenzialmente tossiche (Bence et al., 2001).

Anche se il ruolo degli aggregati non è ancora stato chiarito, uno studio condotto da Sanchez e collaboratori ha mostrato come l'infusione del colorante Congo-Red in un modello murino transgenico di Malattia di Huntington è in grado di promuovere la dissociazione degli aggregati di huntingtina e di migliorare i sintomi motori, proponendo ancora una volta il ruolo tossico degli aggregati (Sanchez et al., 2003). Un contributo importante nell'individuazione del ruolo tossico degli aggregati è stato fornito dal gruppo di Hayden che ha evidenziato nel taglio

proteolitico dell'huntingtina mutato a carico della caspasi-6, l'evento principale che provoca l'attivazione a cascata delle altre caspasi (Graham et al., 2008). Questi risultati indicano che studi atti a bloccare l'attività della caspasi-6 potrebbero rappresentare una strategia vincente per bloccare/rallentare la produzione dei frammenti tossici e quindi la progressione della patologia.

2) Disfunzione mitocondriale

I mitocondri svolgono un ruolo importante negli eventi neuropatologici che si verificano nei neuroni striatali (Orth et al., 2001; Beal et al., 1994). Tra le numerose anomalie molecolari osservate, i neuroni Huntington sono caratterizzati in primo luogo da un deficit nell'energia metabolica, come dimostrato dalla diminuita produzione di ATP dovuta all'alterata funzionalità della catena respiratoria mitocondriale, da un alterato potenziale di membrana mitocondriale e da una anomala omeostasi dello ione calcio (Panov et al., 2002). In secondo luogo sono state osservate anomalie in altri processi cellulari: quando sottoposte a stimoli tossici, nelle cellule che esprimono huntingtina mutata si osserva un aumento del rilascio mitocondriale di citocromo C (fattore proapoptotico) e l'attivazione delle caspasi-9 e 3 (Rigamonti et al., 2001). Panov e collaboratori hanno osservato che i mitocondri di linfoblasti di pazienti affetti presentano un potenziale di membrana più basso e depolarizzano in seguito a stimoli di calcio più bassi rispetto agli organelli di soggetti controllo. Dopo aver confermato gli stessi difetti nell'omeostasi del calcio in mitocondri di neuroni del cervello di topi transgenici esprimenti l'huntingtina mutata intera, questi ricercatori hanno localizzato il frammento amminoterminale della proteina mutata sulle membrane dei mitocondri neuronali. Incubando mitocondri sani con una proteina caratterizzata dal tratto polyQ sono riusciti a riprodurre il difetto del livello di Ca^{2+} degli organelli osservato nei pazienti e nei topi transgenici. In base a questi dati, l'huntingtina mutata sembra alterare il funzionamento dei mitocondri, causando la morte neuronale per deficit metabolico. L'alterazione dell'omeostasi del calcio potrebbe essere causata dalla formazione di canali ionici da parte del tratto poliglutamminico della proteina mutata, rilevata appunto sulle membrane mitocondriali; tuttavia i reali meccanismi alla base di queste anomalie restano ancora da chiarire (Panov et al., 2002).

3) Interazione anomala con altre proteine

I ricercatori hanno condotto numerosi esperimenti per comprendere con quali proteine interagisce l'huntingtina nella sua forma sana e in quella mutata, al fine di comprendere se tali interazioni in presenza della mutazione variassero. In particolare, i ricercatori hanno cercato proteine striato-specifiche che interagissero con l'huntingtina e che fossero coinvolte nella degenerazione dello striato. Tuttavia nessuno degli interattori dell'huntingtina finora scoperti ha una espressione striato specifica e si è osservato invece che essi sono distribuiti in modo omogeneo in tutto il CNS. Questa evidenza suggerisce che la degenerazione striatale selettiva nell'Huntington non sia probabilmente causata da una variazione del legame fra huntingtina mutata e proteine striato specifiche che sottratte al loro *pathway* potrebbero causare alterazioni in questa zona cerebrale. Sono state identificate numerose proteine in grado di

interagire con l'huntingtina e di influenzare diversi processi cellulari e tali proteine possono essere classificate in tre principali categorie in base alla loro funzione:

- Proteine implicate nel traffico vescicolare e nella trasmissione sinaptica
- Proteine coinvolte nella trasduzione del segnale
- Proteine coinvolte in eventi trascrizionali

Tra le proteine del primo gruppo troviamo HAP1 (huntingtin associated protein 1) una proteina espressa in numerosi tessuti, compreso quello cerebrale, capace di interagire con la porzione N-terminale dell'huntingtina con un'affinità di legame proporzionale alla lunghezza del tratto poliglutammino (Wellington et al., 1997), e con la subunità p150 della dinactina.

HIP1 (huntingtin interacting protein 1) interagisce invece con gli aminoacidi a valle del tratto poliglutammino dell'huntingtina wild-type ed è in grado di legare l' α -adattina e la latrina: questo supporta l'idea di un coinvolgimento della proteina nell'assemblamento del citoscheletro e nell'endocitosi. Tale interazione, ostacolando la formazione del complesso HIP1-HIP1, previene anche l'attivazione della caspasi-8 (Gervais et al., 2002).

L'huntingtina lega anche proteine del complesso sinaptico come la protein-chinasi C, PACSIN-1 (il substrato della casein-chinasi nei neuroni), PSD95 (postsynaptic density 95) partecipando alla regolazione dell'attività sinaptica (Smith and Brundin, 2005).

L'elevato numero di residui di prolina contenuti nell'huntingtina facilita le interazioni con proteine contenenti il dominio SH3 come ad esempio il recettore Grb2 (growth factor receptor bound protein), il recettori per l'EGF (epidermal growth factor) o le RasGAP (Ras GTPase-activating protein) coinvolte nella trasduzione del segnale (Liu et al., 1997).

Numerosi studi evidenziano infine la capacità dell'huntingtina di legare innumerevoli fattori di trascrizione ad indicazione di un coinvolgimento della proteina nel controllo della trascrizione genica (Cha et al., 2007).

4) Eccitotossicità

Il fenomeno dell'eccitotossicità definisce la morte neuronale ad opera di una incrementata attività della trasmissione glutamatergica. L'eccitotossicità è stata ritenuta un evento potenzialmente responsabile della Malattia di Huntington in quanto l'iniezione di aminoacidi eccitatori nello striato di modelli murini è causa di morte neuronale e fenotipo patologico simile a quello osservato nei pazienti Huntington (Di Figlia et al., 1990). Inoltre, alcuni studi mostrano riduzione dei recettori di glutammato nel cervello Huntington, in modo specifico del recettore mGluR2 (Cha et al., 1999). Questo recettore regola il rilascio del glutammato ai terminali presinaptici della connessione cortico-striatale e la sua riduzione causa di conseguenza una sovrastimolazione postsinaptica dei neuroni striatali e quindi tossicità. Cambiamenti nei livelli di recettori NMDAR e delle subunità che li costituiscono determinano un'alterazione della loro attività recettoriale (Cepeda et al., 2001; Jarabek et al., 2004; Ali et al., 2006; Benn et al., 2007). Ad esempio, nell'Huntington, sono stati osservati un incremento della subunità NR1A, associato ad un'aumentata attività dei recettori NMDAR, e un decremento dei livelli della subunità NR2B causato da un'alterazione dell'espressione genica e

da un'aumentata proteolisi della subunità stessa da parte delle calpaine (Zeron et al., 2002; Cowan et al., 2008).

5) Alterazione della trascrizione genica

Numerosi fattori trascrizionali interagiscono con l'huntingtina suggerendo un coinvolgimento di quest'ultima nell'espressione genica.

Questa ipotesi ha portato i ricercatori a condurre numerosi esperimenti per indagare su questo ruolo della proteina. Per avere una visione generale della variazione dell'espressione genica in presenza della mutazione, sono stati fatti studi utilizzando la tecnica dei chip a DNA, anche chiamata *Microarray*, in modelli cellulari e animali esprimenti la proteina normale e mutata, intera o solo il frammento amino-terminale (Sipione et al., 2002; Luthi-Carter et al., 2002; Chan et al., 2002). Nel 2006 è stato effettuato il primo profilo di espressione genica anche in pazienti HD (Hodges et al., 2006). Da questo studio è emerso che variazioni nel profilo di espressione genica sono maggiormente presenti nell'area del caudato e della corteccia.

L'insieme di questi studi ha evidenziato come l'espressione di numerosi geni sia influenzata dalla proteina mutata implicando in questo modo il suo coinvolgimento in determinati processi cellulari.

A spiegazione di questo fenomeno vi è l'ipotesi che l'huntingtina mutata causi modificazione della trascrizione genica interagendo con numerosi fattori trascrizionali, e che l'interazione tra loro avvenga a livello del tratto N-terminale dell'huntingtina. L'ipotesi più accreditata è che il tratto di glutammine espanso della proteina mutata interferisce con il tratto poliQ di questi fattori. Inoltre i frammenti mutati mostrano una maggior capacità di migrare nel nucleo rispetto ai sani, dove si ipotizza che interagiscano scorrettamente con le altre proteine nucleari. Ancora, i frammenti più corti di huntingtina mutata tendono a formare, sia *in vitro* sia *in vivo*, aggregati proteici con una frequenza maggiore rispetto ai sani attraendo in questo modo i fattori trascrizionali e sottraendoli così alle loro funzioni all'interno della cellula.

L'huntingtina mutata è in grado di interagire sia con il dominio poli-glutammico (Nucifora et al., 2001) che con il dominio acetiltrasferasico (Steffan et al., 2001) di CBP (*CREB Binding Protein*), un fattore trascrizionale coinvolto nella formazione del complesso CREB (*cyclic-AMP response element binding factor*). In presenza della proteina mutata CBP subisce inoltre una eccessiva ubiquitinazione, viene degradato e la sua assenza provoca una minor espressione dei geni CREB controllati (Jiang et al., 2003), importanti per la sopravvivenza dei neuroni (Lonze et al., 2002). L'analisi di questo fattore risulta interessante nella malattia di Huntington visto che topi knock-out per CREB mostrano un fenotipo con neurodegenerazione striatale (Mantamadiotis et al., 2002).

L'huntingtina mutata interagisce inoltre col fattore trascrizionale TAF_{II}130, che appartiene al complesso trascrizionale di TBP (*TATA Binding Protein*) ed è fondamentale per l'attività della RNA polimerasi II (Shimoata et al., 2000; Dunah et al., 2002), con i corepressori N-CoR (*Nuclear Corepressor Receptor*) e m-Sin3a (*nuclear corepressor Sin3a*) e con il fattore trascrizionale Sp1 (Dunah et al., 2002; Li et al., 2002). Tutte queste proteine sono state riscontrate all'interno degli aggregati proteici e il loro sequestro causa alterazioni trascrizionali dei geni che regolano.

Geni la cui espressione viene modificata sono coinvolti nel metabolismo lipidico, nel *signalling* cellulare, nel traffico vescicolare, nel processamento dell'RNA, nella neurotrasmissione e nel metabolismo lipidico (Sipione et al., 2002).

In particolare studi condotti da questo laboratorio hanno evidenziato una riduzione dei livelli di mRNA di tre enzimi chiave nella biosintesi del colesterolo (HmgCoReduttasi, Lanosterol 14 alpha-demetilasi e 7-deidrocolesterol-reduttasi) in corteccia e striato di topi transgenici per l'Huntington. Questi dati sono stati confermati da studi condotti su fibroblasti derivanti da pazienti Huntington dove si è riscontrato una riduzione nella biosintesi del colesterolo. La riduzione della trascrizione dei geni coinvolti nella sintesi del colesterolo è dovuta ad una diminuita traslocazione nucleare di SREBP, il fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione della trascrizione dei geni chiave della sintesi di colesterolo (Valenza et al., 2005). Successive analisi biochimiche e di spettrometria di massa hanno confermato che l'attività ed i livelli di numerosi precursori del colesterolo sono ridotti in diversi modelli animali di HD (topi R6/2, YAC46-72-128, knock-in e ratti transgenici) con conseguente diminuzione del contenuto totale di steroli/colesterolo (Valenza et al., 2005; Valenza et al., 2007a,b; Valenza et al., 2010). Inoltre a conferma di questi studi, è stato osservato un alterato metabolismo del colesterolo cerebrale anche nei pazienti Huntington già da stadi iniziali della malattia (Leoni et al., 2008). L'insieme dei dati sopra discussi verrà ulteriormente approfondita nei paragrafi introduttivi sul ruolo del colesterolo nella malattia di Huntington.

Funzioni dell'huntingtina sana

Sebbene sia assodato che la Malattia di Huntington insorga a causa di un'espansione delle triplette CAG del gene codificante per l'huntingtina (*gain of function*), numerosi studi hanno evidenziato come la perdita delle funzioni fisiologiche mediate dall'huntingtina sana possa contribuire al fenotipo neuropatologico (Cattaneo et al., 2001).

A partire dall'identificazione del gene IT15 nel 1993 da parte dell'Huntington's Disease Research Group, la maggior parte degli sforzi volti alla comprensione dei meccanismi alla base della patologia si è focalizzata sullo studio dell'huntingtina mutata e sulle disfunzioni derivate dalla sua presenza, in un'ottica generale di *Gain of Function*. Di conseguenza la valutazione sperimentale delle funzioni della proteina sana e l'impatto della perdita delle sue attività nella patologia, non è stato inizialmente considerato. Tuttavia recenti risultati hanno indicato che la proteina nella sua forma sana svolge attività fondamentali nei neuroni cerebrali, suggerendo che la perdita di tali funzioni possa contribuire alla Malattia di Huntington. L'huntingtina infatti:

1. Partecipa allo sviluppo embrionale
2. Ha funzione anti-apoptica
3. Preserva l'attività sinaptica e Neuroprotezione
4. Stimola la produzione di BDNF

1) Ruolo durante l'embriogenesi

L'huntingtina è indispensabile per un corretto sviluppo embrionale, come emerge dal fatto che modelli murini *knock-out* omozigoti per l'huntingtina ($Hdh^{-/-}$) non sopravvivono oltre l'ottavo

giorno di vita embrionale (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). I difetti di sviluppo osservati in tali embrioni sono la conseguenza di difetti di organizzazione dei tessuti extra-embriionali (Dragatsis et al., 1998) probabilmente dovuti ad alterazioni delle funzioni trofiche dell'endoderma viscerale. Una riduzione dei livelli di huntingtina del 50% causa invece difetti nell'epiblasto, la struttura da cui deriva il tubo neurale, e malformazioni della corteccia e dello striato (White et al., 1997; Auerbach et al., 2001). Questi dati indicano che, oltre a svolgere funzioni extra-embriionali precoci, l'huntingtina partecipa alla formazione del sistema nervoso centrale nelle fasi successive alla gastrulazione. Contrariamente, topi *knock-out* eterozigoti ($Hdh^{-/+}$), generati parallelamente non presentano alcun fenotipo apprezzabile (Duyao et al., 1995; Zeitlin et al., 1995), ad eccezione di un solo modello *knock-out* eterozigote che presenta sintomi assimilabili alla Malattia di Huntington, con degenerazione selettiva subtalamica e del globo pallido (Nasir et al., 1995). I deficit di quest'ultimo modello *knock-out* sono giustificati dall'espressione di un piccolo frammento di proteina, in grado di esercitare un possibile effetto di dominanza negativa sulla proteina intera, alterandone la funzionalità (O'Kusky et al., 1999).

Inoltre, è stato osservato che l'huntingtina mutata può compensare l'assenza dell'huntingtina endogena in topi *knock-out* determinando la sopravvivenza degli embrioni (Leavitt et al., 2001), perciò è ragionevole pensare che le funzioni svolte dalla proteina durante lo sviluppo embrionale siano indipendenti dalla lunghezza del tratto polyQ. Gli studi finora citati non mostrano un legame fra l'huntingtina mutata ed alterazioni durante lo sviluppo embrionale; solo studi recenti hanno evidenziato alterazioni del cervello fin dalle fasi precoci dello sviluppo embrionale in presenza dell'huntingtina mutata. Henshall e collaboratori hanno mostrato che la riduzione dei livelli di huntingtina in embrioni di Zebrafish causa alterazioni nella parte anteriore della piastra neurale (Henshall et al., 2009). Un recente studio suggerisce che l'huntingtina mutata altera il normale sviluppo del cervello durante l'embriogenesi (Molero et al., 2009). Godin e colleghi hanno dimostrato come l'inattivazione dell'huntingtina in embrioni murini a E14.5 induce il differenziamento prematuro dei progenitori corticali dovuto ad un difetto nell'orientamento del fuso mitotico dei progenitori in divisione (Godin et al., 2010). Questi studi pongono le basi per avanzare l'ipotesi che la Malattia di Huntington possa essere considerata una patologia della sviluppo.

2) Ruolo Antiapoptotico

Oltre ad avere un ruolo fondamentale nella regolazione dello sviluppo embrionale, l'huntingtina svolge anche altre funzioni, tra le quali quella antiapoptotica. La sovraespressione di huntingtina sana protegge le cellule da stimoli tossici (Rigamonti et al., 2000) e previene la morte cellulare indotta dalla proteina mutata (Ho et al., 2001). Al contrario cellule deplete di huntingtina normale sono più sensibili alla morte cellulare per apoptosi e mostrano un incremento di attività della caspasi-3 rispetto a cellule controllo (Zhang et al., 2006). Anche studi *in vivo* hanno permesso di consolidare l'idea di una funzione antiapoptotica dell'huntingtina sana: l'inattivazione neuronale del gene dell'huntingtina nel topo adulto, mediante il sistema di ricombinazione sitospecifico Cre-LoxP, determina apoptosi cellulare nell'ippocampo, nella corteccia e nello striato (Dragatsis et al., 2000). Similmente,

analisi morfometriche e ultrastrutturali di topi knock-out eterozigoti hanno rivelato la presenza di cellule apoptotiche nel cervello adulto (Nasir et al., 1995). I meccanismi attraverso i quali l'huntingtina protegge la cellula dall'apoptosi devono ancora essere chiariti. Un primo studio ha mostrato come la proteina sana blocchi la formazione di un aptosoma funzionale e la conseguente attivazione della caspasi-3 e della caspasi-9 (Rigamonti et al., 2000; 2001). In linea con questa scoperta Robert Friedlander e colleghi del *Department of Neurosurgery, Brigham and Women's Hospital, Boston*, hanno mostrato come l'huntingtina sana interagisca con la caspasi-3 attiva inibendone la funzione proteolitica (Zhang et al., 2006). Altri autori hanno invece osservato, in presenza della proteina sana, un'inibizione della formazione del complesso proapoptotico HIPPI-HIP1 (Hackam et al., 2000; Gervais et al., 2002). Studi successivi hanno rivelato che l'huntingtina sana è substrato di una serotonintreonin chinasi (Akt) che attiva *pro-survival pathways* (Rangone et al., 2004).

3) Attività Sinaptica e Neuroprotezione

L'huntingtina sana svolge anche un ruolo importante nel trasporto assonale. Le prime scoperte a testimonianza di tale coinvolgimento della proteina normale derivano da uno studio che ha mostrato come la riduzione dell'huntingtina in drosophila arresti il trasporto assonale (Gunawardena et al., 2003). Pubblicazioni successive hanno evidenziato anche la capacità della proteina di regolare il traffico dei mitocondri: in neuroni embrionali striatali prelevati da topi esprimanti solo un allele di huntingtina *wild-type* o il 50% dei livelli di huntingtina sana, si è osservata infatti una progressiva riduzione della mobilitazione dei mitocondri (Trushina et al., 2004). E' stato ipotizzato che la capacità dell'huntingtina di regolare il trasporto assonale derivi dalla sua partecipazione alla formazione di complessi motori sui microtubuli. La comunicazione tra neuroni è regolata da numerose proteine sinaptiche: l'huntingtina sana, interagendo con proteine citoscheletriche e proteine vescicolari fondamentali per l'eso-endocitosi nei terminali neuronali, partecipa al controllo dell'attività sinaptica. Tali interazioni dipendono dalla lunghezza del tratto poligluttammico e sono favorite dalla presenza di un CAG espanso. Questo giustifica le alterazioni di trasmissione sinaptica riscontrate in presenza della proteina mutata (Smith and Brundin, 2005).

Il gruppo di Scott Zeitlin si è proposto di indagare il ruolo fisiologico dell'huntingtina nel cervello adulto studiando le conseguenze della perdita di espressione della proteina nel sistema nervoso centrale di topo. L'inattivazione tessuto specifica del gene *Hdh* nel SNC, ha portato all'eliminazione dell'espressione dell'huntingtina in un'ampia popolazione di neuroni del cervello e del cervelletto, determinando degenerazione neuronale, disturbi motori e mortalità precoce. Sono stati osservati anche fenomeni di gliosi e degenerazione di fibre assonali, compatibili con la localizzazione dell'huntingtina negli assoni (Dragatsis et al., 2000). Inoltre, Zhang e collaboratori hanno osservato in primo luogo che c'è una stretta relazione tra riduzione della proteina endogena sana e fenotipo neurologico, e in secondo luogo, che in topi transgenici sovraesprimanti huntingtina sana l'aumento del livello di proteina sana conferisce neuroprotezione da stimoli tossici (Zhang et al., 2003).

4) Produzione del BDNF

Nonostante questi studi abbiano aperto nuove ed interessanti prospettive sul ruolo benefico svolto dall'huntingtina normale, lasciando intravedere nuove possibili chiavi di interpretazione della patologia, resta tuttora da spiegare il meccanismo attraverso il quale si sviluppa la degenerazione selettiva dei neuroni striatali tipica della corea di Huntington. Tutti gli studi volti a definire il ruolo fisiologico dell'huntingtina, hanno dimostrato che essa riveste una funzione benefica che si manifesta in maniera ubiquitaria nel Sistema Nervoso Centrale. Quindi una sua perdita, dovuta alla mutazione, dovrebbe produrre un fenomeno neurodegenerativo diffuso e non una morte localizzata di specifiche popolazioni neuronali.

Diverse sono le ipotesi che sono state prese in considerazione nel tentativo di fornire spiegazione della peculiare degenerazione selettiva a carico dei neuroni striatali e numerose disfunzioni sono state attribuite alla perdita di funzionalità dell'huntingtina sana. In questa tesi si è preso in esame una delle alterazioni alla base della Malattia di Huntington già molto studiate: il BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), fattore neurotrofico fondamentale per lo sviluppo, la maturazione e la sopravvivenza dei neuroni striatali (Ivkovic & Erlich, 1999; Saudou et al., 1998).

Molti studi svolti nel nostro laboratorio, e confermati da altri colleghi, hanno evidenziato un possibile coinvolgimento dell'huntingtina sana nella sintesi e nel trasporto del BDNF (Zuccato et al., 2007), suggerendo un ruolo dell'huntingtina sana in questo pathway, ruolo che viene perso in seguito alla mutazione. Durante il mio dottorato ho investigati aspetti ancora poco chiari dell'impatto della disfunzione del BDNF nella patogenesi della malattia di Huntington.

In questa tesi saranno presentati dati riguardanti l'effetto dell'huntingtina su due specifici meccanismi cellulari quali il BDNF ed il colesterolo. In questa parte di introduzione verranno quindi presentati dati di base relativi ad entrambi i meccanismi presi in esame.

IL BDNF NELLA MALATTIA DI HUNTINGTON

Il BDNF fu scoperto nel 1982 (Barde et al., 1982) e venne classificato come uno dei componenti di una famiglia di molecole ad attività neurotrofica, alla quale appartengono anche l'NGF (nerve growth factor), NT-3 (neurotrophin 3) e NT-4 (neurotrophin 4). Queste proteine sono fondamentali per il controllo della proliferazione, del differenziamento e della maturazione delle cellule nervose. Il BDNF condivide il 50% della propria sequenza aminoacidica con le altre neurotrofine.

Numerosi studi hanno dimostrato che il BDNF è un potente fattore neurotrofico per i neuroni GABA-ergici striatali (Mizuno et al., 1994; Ventimiglia et al., 1995) e che svolge un ruolo fondamentale nella sopravvivenza di tali cellule in particolare stimolando il differenziamento morfologico dei neuroni contenenti DARPP-32 (marcatore specifico della maturazione dei neuroni medio spinosi) (Nakao et al., 1995). Il BDNF protegge i neuroni dagli insulti eccitotossici, ipossici e ipoglicemici (Nakao et al., 1995) ed è coinvolto nel rilascio corticale di glutammato (Takei et al., 1997; 1998; Pascual et al., 2001), nella risposta adattativa

neuronale, nei processi mnemonici (Bekinschtein et al., 2008 (a) e (b); Slipcuk et al., 2009), nella plasticità neuronale (Akaneya et al., 1997; Bramham et al., 2005) e nella generazione di potenziali a lungo termine nell'ippocampo (Figurov et al., 1996).

Il gene del BDNF umano

Il gene del BDNF umano, come descritto dal gruppo di ricerca diretto da Tonis Timmusk del Department of Gene Technology, Tallinn University of Technology, Estonia, si estende per circa 70 Kb ed è costituito complessivamente da 11 esoni e 9 promotori funzionali (Pruunsild et al., 2007), responsabili della formazione di diversi trascritti tessuto-specifici, accomunati dalla regione 3' codificante per la proteina (l'esone IXd) e distinguibili per le sequenze UTR (untranslated region) in 5' (Figura 3)

Nell'esone IX ritroviamo la sequenza destinata ad essere tradotta nella proteina BDNF, delimitata dalla tripletta d'inizio traduzione ATG e dal codone di stop TAG. Tale esone è suddiviso in 4 regioni (a, b, c, d). Generalmente durante il processo di trascrizione l'esone IX viene coniugato con un altro esone a monte (I-VIIIh) e in questi casi i trascritti maturi si trovano ad includere solamente la porzione più a valle dell'esone IX, ovvero la regione IXd.

La traduzione dei trascritti contenenti gli esoni non codificanti II, III, IV, V, Vh, VI e VIIIh comincia dall'ATG posizionato sull'esone IX. Gli esoni I, VII e VIII presentano invece dei codoni ATG interni che possono essere utilizzati come sito d'inizio traduzione, portando conseguentemente alla formazione di una proteina prepro-BDNF con un N-terminale più lungo. Negli esoni II, V e VI sono presenti diversi siti di splicing che determinano la formazione di trascritti accomunati dalla regione codificante che differiscono tra loro per la lunghezza delle 5'UTR. Gli esoni VIII e VIIIh sono raramente utilizzati durante il processo trascrizionale e sempre in associazione con l'esone V in 5'. I trascritti alternativi del BDNF hanno un'espressione tessuto-specifica. E' stato dimostrato che gli RNA messaggeri contenenti gli esoni II, III, IV, V e VII sono prevalentemente rilevabili a livello cerebrale, mentre gli altri trascritti, in particolare quelli contenenti gli esoni VI e IXabcd sono espressi nei tessuti periferici (Pruunsild et al., 2007)

Un numero così elevato di esoni, la presenza di più siti d'inizio trascrizione, di promotori e di diversi siti di splicing lasciano presupporre una complessa attività regolatoria dell'espressione di questo gene. Numerosi studi sono quindi stati condotti per identificare le possibili sequenze implicate nella regolazione dell'espressione del BDNF. L'attività del promotore II del BDNF è regolata da una sequenza silenziatrice indicata con la sigla RE1/NRSE (repressor element 1/neuron-restrictive silencer factor), la cui attività repressiva è promossa da un fattore di trascrizione chiamato REST/NRSF (RE1silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor) (Timmusk et al., 1999). Il promotore dell'esone IV è caratterizzato dalla presenza di tre elementi responsivi al calcio CaRE1, CaRE2 e CaRE3/CRE che rispondono all'incremento di calcio indotto dall'attivazione dei recettori glutammatergici NMDA attraverso la mediazione del CREB (cAMP responsive element binding protein). CaRE1 e CaRE3 sono responsivi anche al fattore di trascrizione CaRF (Calcium responsive transcription factor), mentre l'attività di CaRE2 può dipendere anche dal legame col fattore di trascrizione USF1/USF2 (upstream stimulatory

factor 1 and 2) (Chen et al., 2004). E' stata poi osservata la presenza di trascritti definiti antiBDNF, RNA antisenso non codificanti, trascritti a partire dal gene del BDNF umano, capaci di formare col trascritto senso del BDNF un RNA a doppio filamento non traducibile in proteina (Pruunsild et al., 2007).

Sintesi e secrezione del BDNF

La proteina BDNF è sintetizzata come pre-pro-BDNF. Il pre-dominio di 18 aminoacidi è immediatamente tagliato dopo la traslocazione della proteina nascente nel reticolo endoplasmatico. Il pro-BDNF (32Kda) viene trasportato dapprima alle cisterne cis dell'apparato del Golgi e successivamente al trans Golgi tramite un trasporto mediato da vescicole. Dal trans-Golgi si diramano due vie di secrezione del BDNF, una costitutiva ed una regolata. Per la secrezione costitutiva, il BDNF subisce un taglio proteolitico del predominio da parte di proteine specifiche del trans-Golgi. La forma matura (14Kda) viene internalizzata in vescicole e trasportate verso la membrana plasmatica per la secrezione. Il BDNF secreto interagisce coi recettori Trk-B pre e post-sinaptici per innescare le diverse vie di trasduzione dei segnali intracellulari. Per la secrezione regolata, il pro-BDNF viene internalizzato in granuli, che dal trans-Golgi trasportano la forma non matura della neurotrofina verso le membrane plasmatiche. Durante il trasporto enzimi proteolitici effettuano il taglio che consente la conversione del pro-BDNF in BDNF maturo. I granuli contenenti la forma matura della neurotrofina si accumulano a livello delle membrane e la secrezione del BDNF avviene solo in seguito a stimoli specifici (Lessmann et al., 2003).

Il proBDNF di 32 Kda oltre a dare origine alla forma matura della neurotrofina, può svolgere una funzione extracellulare nei terminali sinaptici, attivando pathways intracellulari (Lee et al., 2001; Woo et al., 2005) e promovendo la morte cellulare per apoptosi (Teng et al., 2005).

Il BDNF è presente soprattutto nei neuroni (Murer et al., 2001), ma alcuni lavori hanno evidenziato anche la capacità delle cellule gliali di esprimere il BDNF in condizioni di stress metabolico (Ceccatelli et al., 1991; Batchelor et al., 1999). Furukawa e colleghi (1998) hanno riportato la presenza di oligodendrociti BDNF-immunoreattivi nella sostanza bianca del cervello di ratto e studi successivi hanno dimostrato la capacità della microglia di secernere ridotte quantità di BDNF in vitro. Sebbene questi dati riportino evidenze della capacità delle cellule gliali di produrre BDNF, l'ipotesi più accreditata è che la neurotrofina presente in tali cellule venga internalizzata dall'ambiente esterno, come suggerito dalla presenza sulla membrana plasmatica della forma tronca del recettore TrkB, capace di legare il BDNF e di promuoverne l'internalizzazione, ma non in grado di tradurre il segnale perché privo di dominio catalitico (Frisen et al., 1993; Rudge et al., 1994; Roback et al., 1995; Nakajima et al., 1998).

Il BDNF proteina è ampiamente distribuito nel sistema nervoso centrale, con livelli più elevati nella corteccia cerebrale, nello striato, nel proencefalo, nell'ippocampo, nell'ipotalamo, nel tronco encefalico e nel cervelletto (Murer et al., 2001). L'espressione del messaggero del BDNF e della proteina sono sostanzialmente simili nella maggior parte delle regioni cerebrali. Alcuni studi però hanno rivelato nello striato la presenza della proteina e la mancanza del messaggero (Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004).

Poiché i neuroni corticali che innervano lo striato contengono elevate quantità di messaggero del BDNF, è stato ipotizzato che la maggior parte della neurotrofina nello striato abbia origine dalla corteccia (strati II-III e IV-V) e venisse trasportata per via anterograda allo striato (Dugich-Djordjevic et al., 1995; Altar et al., 1997; Fusco et al., 2003; Baquet et al., 2004).

Trasporto anterogrado e retrogrado del BDNF

La presenza di BDNF nei neuroni striatali è il risultato di un trasporto anterogrado che consente lo spostamento della neurotrofina dalla corteccia e, in modo minore, dalla pars compacta della substantia nigra, allo striato. Artefici del trasporto anterogrado sono i neuroni piramidali di proiezione, localizzati nei layers corticali II, V e VI. Il fenomeno del trasporto anterogrado del BDNF dalla corteccia allo striato è stato ampiamente dimostrato. Nei roditori, in seguito ad iniezione intracerebroventricolare con colchicina, un farmaco che ostacola l'assemblamento dei microtubuli, si è osservata una netta riduzione del contenuto striatale di BDNF e un parallelo aumento dell'immunoreattività per tale neurotrofina nei corpi cellulari dei neuroni della corteccia e della substantia nigra (Altar et al., 1997). Inoltre, la rimozione unilaterale della corteccia frontale e parietale nei roditori ha determinato una diminuzione della immunoreattività per il BDNF nello striato (Altar et al., 1997). Per escludere un eventuale contributo dei neuroni dello striato nella produzione di BDNF è stata operata, dallo stesso gruppo di ricercatori, un'iniezione intrastriatale con acido chinolinico. Questa tossina è in grado di distruggere in maniera selettiva i neuroni striatali risparmiando le terminazioni assoniche afferenti dalla corteccia e dalla substantia nigra. In questa situazione non si è osservata nello striato alcuna diminuzione dell'immunoreattività per il BDNF, a conferma dell'assenza di contributo dei neuroni striatali alla produzione di BDNF (Altar et al., 1997).

Questi studi sono stati però criticati in quanto l'ablazione della corteccia non blocca solo l'apporto di BDNF, ma danneggia in generale tutta la neurotrasmissione del circuito cortico-striatale. Per questo motivo e per confermare l'esistenza del trasporto anterogrado del BDNF lungo la via corticostriatale, il gene del BDNF è stato inattivato nella corteccia cerebrale di topo (Baquet et al., 2004). In questi modelli animali si è osservata la completa perdita di BDNF nello striato e un decremento del volume corticale e striatale. L'analisi morfologica dei neuroni striatali ha rivelato una riduzione significativa del soma, un assottigliamento dei dendriti e una diminuzione della densità delle spine dendritiche. Non è stato invece osservato un effetto massiccio di morte cellulare (Baquet et al., 2004). Questi risultati evidenziano che il BDNF ha un ruolo fondamentale nella promozione del differenziamento e nel mantenimento di un fenotipo maturo dei neuroni striatali.

Il BDNF oltre ad essere trasportato per via anterograda lungo le afferente cortico-striatali, può subire anche un trasporto retrogrado (Altar et al., 1998) dai processi cellulari al soma mediante l'interazione coi recettori TrkB presenti sui terminali pre-sinaptici (Heerssen et al., 2004). Tale interazione induce una risposta nucleare fondamentale per promuovere la sopravvivenza cellulare e per consentire il recupero da danni cellulari indotti da stimoli tossici (Lindholm et al., 1994; Heerssen et al., 2004).

Il BDNF e la sinapsi cortico-striatale

La sinapsi cortico-striatale è costituita da afferenze glutammatergiche provenienti dalla corteccia che raggiungono i neuroni striatali insieme ad altri importanti elementi cellulari come i neuroni dopaminergici provenienti dalla Substantia Nigra (Figura 4). Il BDNF, trasportato lungo i neuroni piramidali corticali e rilasciato nello spazio sinaptico, può legare i recettori TrkB pre e postsinaptici modulando così la neurotrasmissione. Tali interazioni promuovono il rilascio di glutammato dai neuroni corticali (Jovanovic et al., 2000; Schinder et al., 2000) e inibiscono la trasmissione GABA-ergica a livello post-sinaptico (Tanaka et al., 1997; Wardle et al., 2003). Il rilascio del BDNF nelle sinapsi cortico-striatali è finemente modulato da altri neurotrasmettitori e neuromodulatori come le adenosine e gli endocannabinoidi. Le purine, come l'adenosina difosfato (ADP) o l'adenosina trifosfato (ATP) sono componenti cellulari cruciali, utilizzate come fonte d'energia o per l'assemblamento degli acidi nucleici. Esse possono, inoltre, essere rilasciate nello spazio extracellulare dove agiscono come importanti molecole di segnale, il cui effetto biologico è mediato dai recettori per le purine A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Popoli et al., 2007). I recettori A₂ sono abbondanti nello striato: in particolare i recettori A_{2A} sono localizzati sui neuroni pre-sinaptici dei terminali corticostriatali dove promuovono il rilascio di glutammato dai neuroni corticali. Alcuni studi hanno evidenziato che l'attivazione dei recettori A_{2A} pre-sinaptici, una volta legata l'adenosina, facilita il rilascio di BDNF nello spazio intersinaptico modulando la trasmissione (Diogenes et al., 2004).

I cannabinoidi, i principali costituenti psicoattivi della marijuana, determinano effetti psicotropi interagendo con recettori accoppiati a G proteine. Sono stati identificati due recettori per i cannabinoidi: CB1, distribuito prevalentemente nel sistema nervoso centrale e nei testicoli (Gerard et al., 1991; Westlake et al., 1994) e CB2 distribuito in periferia (Galiegue et al., 1995). Striato e corteccia cerebrale sono popolati da recettori CB1. I cannabinoidi interagendo coi recettori pre-sinaptici della via cortico-striatale inibiscono il rilascio del glutammato e promuovono il rilascio di BDNF dai terminali sinaptici (Marsicano et al., 2003).

Studi in letteratura evidenziano anche il coinvolgimento della glia nel controllo dei livelli di BDNF nelle sinapsi cortico-striatali. Le cellule gliali possono infatti internalizzare e accumulare BDNF mediante il legame della neurotrofina ai recettori TrkB tronchi (Frisen et al., 1993; Rudge et al., 1994; Roback et al., 1995; Nakajima et al., 1998).

Questi studi indicano come la neurotrasmissione cortico-striatale sia finemente modulata.

Riduzione della trascrizione del BDNF nella Malattia di Huntington

Esperimenti in modelli in *vitro* e in *vivo* della Malattia di Huntington condotti nel nostro laboratorio e pubblicati nel 2001, hanno mostrato come l'huntingtina sana, ma non quella mutata, promuova la produzione di BDNF agendo a livello trascrizionale (Zuccato et al., 2001).

La capacità dell'huntingtina di stimolare la produzione di BDNF è stata inizialmente dimostrata *in vitro* in modelli cellulari Huntington. In cellule ST14A, di derivazione neurale ed ingegnerizzate per sovraesprimere l'huntingtina umana normale, si è evidenziato un incremento

della produzione di BDNF rispetto ai controlli. I livelli di proteina BDNF sono invece significativamente ridotti in cellule che sovraesprimono la proteina huntingtina mutata (Zuccato et al., 2001). Un secondo gruppo di esperimenti ha mostrato come l'incremento della produzione di BDNF in cellule esprimenti huntingtina normale sia dovuto ad una promozione della trascrizione a livello del promotore II del gene e come questo effetto si perda in presenza della mutazione (Zuccato et al., 2001). Risultati simili sono stati ottenuti in vivo, in tessuti cerebrali di topi sovraesprimenti l'huntingtina umana normale e mutata (Zuccato et al., 2001). Negli anni successivi numerosi studi hanno confermato la presenza di ridotti livelli di BDNF in diversi modelli animali della Malattia di Huntington: i) topi BAC esprimente l'huntingtina umana intera con 103 glutammine, mostrano una riduzione significativa della trascrizione del BDNF in corteccia accompagnata dalla comparsa dei sintomi motori (Gray et al., 2008); ii) topi R6/2, esprimenti un frammento N-terminale dell'huntingtina mutata di 1,9 Kb contenente 160 glutammine, mostrano una diminuzione nel cervello del trascritto e della proteina BDNF a partire da stadi pre-sintomatici (Zuccato et al., 2005; Apostol et al., 2008); iii) topi knock-in eterozigoti ed omozigoti per l'huntingtina mutata esprimono ridotti livelli di RNA messaggero e proteina BDNF nel cervello (Simmons et al., 2009; Zuccato et al., 2007). Il rilevamento della riduzione dei livelli di BDNF in modelli Huntington ha portato ad ipotizzare la presenza di una disfunzione simile anche nell'uomo.

A dispetto delle difficoltà che si incontrano nell'analisi di campioni autoptici di origine umana, diversi studi sono stati condotti per rilevare i livelli di BDNF nel cervello umano. Il primo studio risale al 2000 quando il Dott. Ferrer dell'Unitat de Neuropatologia, Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Princeps d'Espanya (Bellvitge), Barcelona, analizzando un esiguo numero di campioni (4 pazienti Huntington e 6 controlli) osservò una riduzione dei livelli di BDNF proteina nello striato ma non nella corteccia (Ferrer et al., 2000). Un lavoro del 2004 ha confermato questi dati su tessuti autoptici prelevati da 10 pazienti e 7 controlli (Gauthier et al., 2004). Un terzo studio, oggetto della mio elaborato di tesi per la laurea magistrale, che ha utilizzato la collezione di tessuti più ampia ad oggi analizzata, ha evidenziato una riduzione dei livelli di neurotrofina anche in corteccia (Zuccato et al., 2008). La riduzione del BDNF compare dai primi stadi della patologia. In questo studio sono stati valutati anche i livelli di messaggero del BDNF che mostrano una riduzione significativa nei tessuti autoptici di pazienti Huntington rispetto a tessuti da soggetti controllo (Zuccato et al., 2008).

I diversi risultati ottenuti in questi tre studi potrebbero essere riconducibili alle diverse metodiche analitiche utilizzate e alla diversità dei campioni analizzati. Studi condotti su modelli animali Huntington e controlli hanno mostrato che l'huntingtina sana, ma non quella mutata, è in grado di stimolare la trascrizione del BDNF agendo a livello del promotore II del gene. L'huntingtina mutata, riduce invece la trascrizione del BDNF bloccando principalmente l'attività del promotore II, ma anche dei promotori III e IV.

La regolazione dell'espressione del trascritto II del BDNF dipende principalmente dall'attività di una sequenza silenziante chiamata NRSE/RE1 (*Neuron-Restrictive Silencer Element/Repressor Element1*) situata a monte dell'esone II. Il *neuron-restrictive silencer factor* (NRSF), chiamato anche *repressor element 1 silencing transcription factor* (REST), è il fattore trascrizionale capace di legare la sequenza RE1/NRSE e di attivare la sua capacità silenziante.

Nel 2003, il nostro laboratorio ha dimostrato che l'huntingtina sana è capace di trattenere REST nel citoplasma evitandone la traslocazione nel nucleo e promuovendo la trascrizione del gene codificante per la neurotrofina BDNF (Zuccato et al., 2003). L'huntingtina mutata, presentando una ridotta capacità di legare il fattore REST, permette il suo ingresso all'interno del nucleo e il suo legame alla sequenza NRSE presente a monte dell'esone II, bloccando così la trascrizione del BDNF (Zuccato et al., 2003; Zuccato et al., 2007). La sequenza NRSE/RE1 è stata trovata in numerosi geni fondamentali per il mantenimento e per il differenziamento neuronale. Uno studio condotto dal gruppo di ricerca del Prof. Noel Buckley della *School of Biochemistry and Microbiology and Biomedical Sciences, University of Leeds, United Kingdom* ha evidenziato la presenza di più di 1300 siti NRSE/RE1 nel genoma murino e umano, la maggior parte dei quali codifica per canali ionici, neurotrasmettitori, fattori di crescita, ormoni, fattori coinvolti nel traffico vescicolare e molecole coinvolte nel mantenimento del citoscheletro e della matrice cellulare (Bruce et al., 2004; Johnson et al., 2008). Studi successivi hanno dimostrato che nella Malattia di Huntington si osserva riduzione della trascrizione genica di altri geni neuronali, oltre al BDNF, controllati da RE1/NRSE (Zuccato et al., 2007).

Mentre la riduzione del trascritto II del BDNF è imputabile ad un decremento di huntingtina normale, la riduzione dei trascritti III e IV è da attribuire alla tossicità dell'huntingtina mutata. In modelli cellulari Huntington è stata osservata una riduzione della trascrizione mediata da CRE (*cAMP responsive element*), un elemento localizzato anche nel promotore III del gene del BDNF (Sugars & Rubinsztein, 2003). L'huntingtina mutata interagendo con CBP (*co-activator binding protein*) ostacola l'attivazione della macchina trascrizionale da parte di CREB (*CRE binding protein*) e determina una riduzione dell'acetilazione degli istoni che porta ad avere una cromatina più compatta e meno accessibile ai fattori di trascrizione (Steffan et al., 2001). La riduzione del trascritto IV può invece essere spiegata con la capacità della proteina mutata di sequestrare Sp1 (*Specificity protein 1*) bloccando la sua interazione fisiologica col co-fattore trascrizionale TAFII-30 (*TBP associated factor 130*) (Dunah et al., 2002; Li et al., 2002).

Alterazione del trasporto del BDNF

L'huntingtina normale, oltre a promuovere la trascrizione del gene del BDNF è anche in grado di promuovere il trasporto vescicolare della neurotrofina.

Studi condotti da ricercatori del gruppo di Frederic Saudou *dell'Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Curie, Irsay Cedex*, in Francia, pubblicati nel 2004, hanno evidenziato la capacità dell'huntingtina sana di promuovere il trasporto vescicolare del BDNF lungo i microtubuli. Questo studio mostra che l'huntingtina sana interagisce con una proteina coinvolta nel trasporto assonale chiamata HAP1 (*huntingtin-associated protein*) che può reclutare alternativamente la subunità p150Glued della dinactina o le catene leggere della chinesina guidando così il trasporto retrogrado e/o anterogrado lungo i neuroni (Gauthier et al., 2004). L'interazione dell'huntingtina mutata con HAP1 invece riduce la capacità di quest'ultimo di associarsi alla subunità p150Glued della dinactina e compromette l'interazione con la chinesina (Gauthier et al., 2004). In questo modo, il trasporto retrogrado ed anterogrado di vescicole contenenti BDNF è ridotto. Uno studio recente condotto da Lu-

Shiun Her e Lawrence S.B. Goldstein del *Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego*, ha riscontrato riduzione del trasporto vescicolare del BDNF nei neuroni primari striatali e ippocampali da modelli murini knock-in della Malattia di Huntington. Non si osservano invece alterazioni del trasporto in neuroni corticali (Her & Glodestein, 2008). Contrariamente alle scoperte del gruppo di Saudou (Gauthier *et al.*, 2004), questo studio ha mostrato che i difetti nel trasporto del BDNF non sono attribuibili ad un danno al complesso motorio che regola il trasporto lungo i microtubuli. Per valutare che la discrepanza dei risultati nei due studi non fosse causata dall'utilizzo di modelli animali o di metodiche analitiche differenti, i ricercatori dell'Università di San Diego hanno provato a riprodurre l'esperimento presentato da Gauthier nel 2004, utilizzando gli stessi modelli e le stesse tecniche di analisi, ma senza ottenere alcuna conferma.

Come proposto da Chang e Orr il trasporto del BDNF potrebbe essere alterato nell'Huntington a causa della presenza di aggregati di huntingtina mutata che vanno a costituire un vero e proprio ostacolo fisico al trasporto (Chang *et al.*, 2006; Orr *et al.*, 2008). Gli aggregati potrebbero anche determinare la precipitazione delle proteine motorie riducendone la forma solubile responsabile del trasporto (Gunawardena *et al.*, 2003; Trushina *et al.*, 2004). Esistono quindi risultati contrastanti circa i meccanismi che soggiacciono all'alterazione del trasporto del BDNF e questo evidenzia la necessità di approfondire questo aspetto della patologia.

Influenza della perdita del BDNF nella malattia di Huntington

Alla luce di queste osservazioni, la riduzione dei livelli di BDNF riscontrata nello striato di modelli animali e di pazienti Huntington può essere riconducibile sia ad una minore trascrizione di BDNF a livello corticale, sia ad un'alterazione del trasporto anterogrado della neurotrofina lungo le afferenze cortico-striatale. Sono stati condotti numerosi studi per valutare una possibile correlazione tra i livelli di BDNF e l'insorgenza o la progressione della malattia.

Topi knock-out per il BDNF, geneticamente ingegnerizzati per essere deficitari nella produzione di BDNF a livello corticale, hanno rilevato una progressiva degenerazione cerebrale e un fenotipo molto simile a quello di topi Huntington (Baquet *et al.*, 2004), una riduzione del volume striatale, un assottigliamento dei dendriti e una diminuzione del numero delle spine dendritiche rispetto ai topi sani. L'inattivazione genetica di un allele del BDNF in un topo Huntington esprime il frammento N-terminale dell'huntingtina umana con un CAG espanso (linea R6/1) determina un peggioramento del fenotipo patologico. In particolare, sono stati osservati un'anticipazione dell'insorgenza dei sintomi e deficit comportamentali (Canals *et al.*, 2004).

La somministrazione di BDNF, mediante l'utilizzo di una minipompa osmotica, così come la sovrappressione genetica del BDNF nella corteccia cerebrale e nello striato di topi R6/1 ha portato ad osservare un miglioramento delle disfunzioni motorie, un recupero di peso del cervello, una riduzione della formazione di aggregati di huntingtina mutata (Canals *et al.*, 2004; Gharami *et al.*, 2008).

Questi studi hanno indicato chiaramente che il deficit di BDNF contribuisce in modo significativo alla patogenesi dell'Huntington.

Strategie per ripristinare i livelli di BDNF

Diversi studi hanno evidenziato che la riduzione dei livelli di BDNF contribuisce significativamente alla patogenesi dell'Huntington, suggerendo di conseguenza un possibile utilizzo della neurotrofina in terapia.

Studi *in vitro*, hanno evidenziato che la somministrazione di BDNF previene la morte cellulare di neuroni che esprimono l'huntingtina mutata (Saudou *et al.*, 1998; Zala *et al.*, 2005). Studi *in vivo* hanno confermato che l'aumento dei livelli di BDNF è benefico in modelli murini di malattia (linea R6/1) (Canals *et al.*, 2004; Gharami *et al.*, 2008).

A dispetto di questi risultati promettenti la somministrazione di BDNF all'uomo crea molti problemi. Il principale è legato alla difficoltà di accertare la quantità di neurotrofina che raggiunge i neuroni danneggiati: se tale quantità fosse troppo piccola potrebbe non essere sufficiente per produrre gli effetti desiderati, se invece fosse troppo elevata potrebbe essere dannosa, poiché il BDNF, oltre a regolare la sopravvivenza e il differenziamento neuronale, modula anche la plasticità neuronale, e ciò potrebbe determinare lo scatenarsi di crisi epilettiche (Binder *et al.*, 2001). Alti livelli di BDNF, inoltre, possono determinare un *feedback* negativo sui recettori TrkB, riducendo così l'attivazione della via del BDNF e bloccando conseguentemente qualsiasi effetto benefico della neurotrofina (Frank *et al.*, 1996; Knusel *et al.*, 1997).

Diverse strategie per incrementare i livelli di BDNF sono state messe in atto. La terapia genica consente di mettere a disposizione dei neuroni il BDNF in modo costante, superando gli svantaggi delle minipompe ad infusione locale (instabilità della proteina immagazzinata nel dispositivo medico e necessità di riempire ripetutamente la minipompa). L'espressione duratura di BDNF mediante vettori virali è stata sperimentata in modelli animali di malattia con risultati incoraggianti (Zuccato *et al.*, 2007). Tuttavia diversi problemi devono essere affrontati prima di passare all'applicazione clinica della terapia: i) regolare l'ammontare di BDNF prodotto localmente, in quanto una produzione eccessiva potrebbe avere effetti deleteri sui circuiti neuronali (Arancibia *et al.*, 2008); ii) diminuire i processi infiammatori che vengono indotti dalla trasduzione del vettore virale e che rendono inapplicabile una terapia a lungo termine; iii) mutagenesi indotta dal vettore virale (Hacein-bey-abina *et al.*, 2008).

Un'altra possibile strategia per incrementare i livelli cerebrali di BDNF potrebbe essere quella di trapiantare cellule ingegnerizzate per esprimere stabilmente il BDNF. La praticabilità di questa applicazione è stata valutata in modelli animali Huntington in cui sono stati trapiantati in un primo tentativo fibroblasti di ratto immortalizzati, geneticamente ingegnerizzati per secernere BDNF (Frim *et al.*, 1993; Martinez-Serrano *et al.*, 1996; Perez-Navarro *et al.*, 1999; 2000) e successivamente cellule staminali neurali prelevate da embrioni umani (Ryu *et al.*, 2004). Modelli animali della Malattia di Huntington sottoposti a trapianto cellulare intra-striatale hanno mostrato un miglioramento dei disturbi motori e una riduzione dei danni

striatali rispetto ad animali non trattati. Anche questa terapia può però presentare alcune problematiche legate soprattutto al rischio di rigetto in seguito a trapianto e alla possibile formazione di tumori. Per superare questi limiti si stanno ricercando nuovi materiali inerti in cui incapsulare le cellule al fine di evitare il rischio di rigetto. Si stanno sviluppando, inoltre, linee stabili di cellule staminali neurali non tumorigeniche, capaci di rilasciare BDNF.

Un'altra strategia terapeutica promettente è quella dell'utilizzo di mimetici del BDNF, ovvero molecole proteiche ricombinanti capaci di agire sugli stessi bersagli del BDNF, i recettori TrkB, e di superare la barriera emato-encefalica in modo più efficace rispetto alla neurotrofina stessa (Fletcher et al., 2008; Pardridge et al., 2006). Anche l'utilizzo di principi attivi in grado di incrementare la produzione endogena di BDNF potrebbe costituire una valida strategia terapeutica. Diversi farmaci già utilizzati in pratica clinica per il trattamento di altre patologie hanno mostrato questo profilo farmacologico e sono risultati in alcuni casi benefici per il trattamento dei sintomi di pazienti Huntington (inibitori del *re-uptake* della serotonina, SSRIs, utilizzati come antidepressivi; il litio, utilizzato in pratica clinica come antimaniacale; la memantina e il riluzolo; antagonisti non competitivi dei recettori NMDA del glutammato) (Seppi et al., 2001).

Dal momento che i meccanismi patologici che portano alla riduzione dei livelli di BDNF nell'Huntington sono noti, un'opzione terapeutica valida potrebbe essere quella di trovare principi attivi in grado di incrementare il trasporto assonale del BDNF o composti in grado di inattivare il silenziatore della trascrizione genica REST/NRSF o di bloccare la sequenza RE1/NRSE bersaglio del suddetto silenziatore (Borrel-Pages et al., 2006; Rigamonti et al., 2007).

Un interessante approccio per incrementare i livelli di BDNF potrebbe essere anche quello di ricorrere ad un regime dietetico restrittivo e ad una costante attività fisica. Studi pre-clinici hanno infatti dimostrato che la riduzione dell'apporto di cibo in modelli murini di malattia (linea HD-N171-82Q) determina una stabilizzazione dei livelli cerebrali di BDNF e un ritardo della comparsa dei sintomi motori (Duan et al., 2003). Similmente, si è osservato che un'attività fisica costante è in grado di rallentare la progressione della patologia in topi Huntington (linee R6/1 e R6/2) e di incrementare i livelli cerebrali di BDNF con un conseguente miglioramento dei sintomi cognitivi e comportamentali (Van Dellen et al., 2000; Hockly et al., 2002; Spires et al., 2004).

II BDNF come potenziale marcatore di patologia

1) Il concetto di biomarker

La disponibilità di un *biomarker*, ossia di una caratteristica cellulare, biochimica o molecolare, oggettivamente misurabile e utilizzabile come indicatore del processo patologico o della risposta farmacologica ad un determinato intervento terapeutico, è uno degli aspetti più importanti della ricerca nell'ambito della Corea di Huntington.

Si distinguono due tipi di *biomarkers*:

- lo *state marker*: marcatore della presenza e della progressione della patologia;
- il *trait marker*: marcatore del meccanismo alla base della patologia.

Sono entrambi di estrema utilità e importanza, con la differenza che il primo si focalizza sullo stato clinico del paziente, mentre il secondo delucida il meccanismo alla base della patologia senza fornire informazioni di tipo clinico.

Nella Malattia di Huntington la mutazione genica viene utilizzata come marcatore definitivo per la diagnosi della patologia, ma non per la sua insorgenza o progressione. La ricerca sta indirizzando la propria attenzione verso la scoperta di uno *state marker* che permetta di prevedere l'insorgenza dei sintomi, che sia sensibile alla lenta progressione della patologia e che sia indicativo dell'efficacia o meno di un trattamento farmacologico.

Un *biomaker* ideale dovrebbe essere misurabile in un tessuto facilmente accessibile in modo non invasivo al fine di rispettare la *compliance* del paziente, dovrebbe essere quantificabile con una procedura non costosa, dovrebbe essere specifico per una malattia e sensibile.

Per l'identificazione di *biomarkers* sono possibili due approcci: il *non-hypothesis driven study* e l'*hypothesis driven study*, il primo mira all'identificazione casuale di un *biomarker* mediante *screening* su larga scala di proteomica, genomica, metabolica, trascrittomica, effettuati su campioni biologici prelevati da pazienti e soggetti sani; il secondo è basato su un'ipotesi maturata in lavori precedenti che hanno evidenziato nei pazienti l'alterazione di processi traduzionali, trascrizionali o metabolici.

2) Stato dell'arte dei biomarkers nella Malattia di Huntington

Negli ultimi anni sono emersi molti candidati *biomarkers* per la Malattia di Huntington che sono attualmente sotto indagine per il loro potenziale utilizzo nella diagnosi precoce di malattia e nella valutazione dell'efficacia di trattamenti farmacologici.

a) Studi di *imaging* funzionale

Progressi nella ricerca di un marker per la malattia di Huntington sono stati condotti soprattutto nel campo delle tecniche di *imaging*. Tali tecniche forniscono informazioni sui cambiamenti strutturali, fisiologici e funzionali che si verificano nel cervello di pazienti Huntington e che potenzialmente possono essere correlate coi sintomi comportamentali, cognitivi e motori (Rosas et al., 2004). Studi di risonanza magnetica (MRI) nei pazienti Huntington hanno evidenziato cambiamenti volumetrici del caudato correlabili con l'età d'insorgenza della malattia e con la lunghezza del CAG (Aylward et al., 1997; 2000; 2003; 2007; Bohanna et al., 2008). L'MRI è in grado di rilevare un declino lineare del volume striatale che ha inizio circa 20 anni prima dell'insorgenza dei sintomi (Paulsen et al., 2008).

Test di *imaging* funzionale come la tomografia ad emissione di positroni (PET) e la risonanza magnetica funzionale (fMRI) sono stati applicati per valutare la presenza di alterazioni funzionali nel cervello di pazienti Huntington indicando i) innumerevoli cambiamenti nel metabolismo cerebrale sia di soggetti pre-sintomatici che di pazienti con malattia conclamata, (Gaura et al., 2004; Pavese et al., 2006), ii) anomalie nell'attività neuronale associata a specifici stimoli cognitivi o motori (Wolf et al., 2007; 2008) e iii) disfunzioni neuronali precoci nei soggetti pre-sintomatici (Zimbelman et al., 2007).

b) Studi di proteomica, trascrittomica e metabolomica

Oltre a specifici cambiamenti nel sistema nervoso centrale, nei modelli Huntington, sono state rivelate anche anomalie sistemiche, dovute al fatto che l'huntingtina è espressa in modo ubiquitario. Sulla base di queste evidenze, mediante diverse strategie, sono stati ricercati nel sangue dei possibili marcatori di malattia. Studi di proteomica condotti su campioni di plasma umano, prelevato a pazienti di diverso grado di malattia, hanno rivelato un'alterazione, parallela alla progressione della patologia, dei livelli di alcune proteine coinvolte nell'attivazione della risposta immunitaria e nel processo neuroinfiammatorio (Dalrymple et al., 2007).

Sulla base del riscontro di alterazioni trascrizionali nel cervello e nei tessuti periferici di individui affetti dalla Malattia di Huntington, il gruppo di ricerca di Dimitri Krainc del Department of neurology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School ha sottoposto ad analisi genomica tramite microarray il sangue di soggetti controllo e di pazienti Huntington. Su circa 30.000 geni analizzati 322 sono risultati significativamente alterati nei pazienti rispetto ai controlli. Per 12 di questi geni l'alterazione è stata confermata mediante un'analisi in PCR (polymerase chain reaction) quantitativa real-time (Borovecki et al., 2005). Uno studio successivo diretto da Luthi-Carter del Laboratory of Functional Neurogenomics, Brain Mind Institute, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), ha smentito i dati presentati da Krainc affermando che le differenze d'espressione riscontrate non erano sufficientemente significative da permettere una valutazione della progressione della malattia (Runne et al., 2007). Questi due lavori (Borovecki et al., 2005; Runne et al., 2007) sottolineano la necessità di un'ulteriore validazione dei potenziali biomarkers prima del loro utilizzo nella pratica clinica.

Non-hypothesis driven studies sono stati condotti anche per valutare l'esistenza di alterazioni metaboliche nei soggetti affetti dalla Malattia di Huntington che potessero essere utilizzate come indicatori di progressione della patologia. Nel 2006 Underwood ha analizzato mediante spettroscopia di massa su campioni di siero, il profilo metabolico di un modello murino transgenico di malattia (HD- N171-N82Q) e di pazienti Huntington ottenendo i) una differenza dei profili metabolici tra topo transgenico e topo wild-type; ii) una differenza tra pazienti Huntington e controlli simile a quella riscontrata nei modelli murini; iii) una differenza tra soggetti pre-sintomatici e pazienti (Underwood et al., 2006).

Queste strategie non hanno però, ad oggi, portato alla scoperta di un marcatore periferico di patologia che possa essere facilmente rilevato nel sangue.

c) Potenziali biomarkers derivanti da hypothesis driven studies

Sebbene un buon biomarker di malattie neurodegenerative non debba necessariamente essere correlato ai meccanismi patologici responsabili della degenerazione a livello centrale, molti gruppi di ricerca hanno progettato esperimenti sulla base di studi precedentemente condotti che avevano individuato pathways coinvolti nella malattia, al fine di identificare un biomarker che permettesse di misurare nel sangue un processo patologico in atto nel sistema nervoso centrale. Risultati sia promettenti che negativi sono stati ottenuti negli ultimi anni mediante questo tipo di studio.

Nel 2001 sono state rilevate in soggetti Huntington alterazioni dell'espressione genica dei

recettori adenosinici A2A e della via trasduzionale a loro associata (Varani et al., 2001). Sulla base di ciò è stato organizzato uno studio hypothesis driven da condurre su un elevato numero di individui (58 controlli e 51 pazienti) al fine di valutare la funzionalità del recettore A2A nelle cellule mononucleate estratte da sangue. Questo studio ha evidenziato delle anomalie nella capacità dei recettori A2A periferici dei pazienti Huntington di legare i loro substrati (Varani et al., 2003), ma non ha mostrato nessuna differenza significativa tra pazienti a diversi stadi di malattia o tra pre-sintomatici e soggetti con patologia conclamata. L'attività dei recettori A2A non può quindi, al momento, essere utilizzata come marcatore periferico di malattia. Una riduzione dell'espressione genica e dell'attività dei recettori per gli endocannabinoidi sembra essere implicata nei difetti neurotrasmettitoriali riscontrati nell'Huntington (Maccarrone et al., 2007). L'alterazione dell'espressione di tali recettori a livello periferico (ad esempio nei linfociti di pazienti Huntington) è però troppo debole perché sia utilizzata come biomarker.

Studi recenti per l'individuazione di un biomarker sono stati condotti nel laboratorio, dove svolgo la mia attività di ricerca.

In un primo studio che ho portato avanti dopo il conseguimento della laurea magistrale, abbiamo dimostrato tramite ChIP un incremento del legame del silenziatore REST/NRSF ai loci RE1/NRSE di geni non neuronali in linfociti di pazienti Huntington rispetto a linfociti di soggetti sani. Questi dati indicano che gli eventi patologici osservati nel cervello sono riprodotti anche in un distretto periferico quali i linfociti e che analisi di ChIP su i loci RE1/NRSE di geni linfo-specifici potrebbero essere utilizzate per valutare la sensibilità, la specificità e l'attività terapeutica di futuri agenti candidati a ripristinare la trascrizione di geni RE1/NRSE-controllati (Marullo et al., 2008).

Un ulteriore studio svolto nel nostro laboratorio si è focalizzato sull'analisi dell'alterazione della via biosintetica del colesterolo (Valenza et al., 2005; 2007a, 2007b) in distretti periferici. Al fine di mantenere un equilibrio omeostatico, il colesterolo del cervello è convertito nel 24-idrossi-colesterolo (24OHC), uno sterolo più polare, capace di superare la barriera emato-encefalica ed entrare nel circolo ematico (Bjorkhem et al., 1997). Studi condotti su topi YAC128 hanno evidenziato una riduzione dei livelli di 24OHC cerebrale e circolante rispetto a topi YAC18 (Valenza et al., 2007).

Recentemente i livelli di 24OHC sono stati misurati anche nell'uomo e si sono riscontrati livelli significativamente più bassi dello sterolo d'interesse nei pazienti Huntington rispetto a soggetti controllo. Un dato interessante è che i livelli di 24OHC nei soggetti pre-sintomatici sono simili a quelli dei controlli sani, tranne in quegli individui che sono prossimi a manifestare i sintomi della malattia in cui si riscontra una riduzione di tali livelli. Questo candida il 24OHC al ruolo di marcatore periferico di malattia (Leoni et al., 2008, 2011).

3) Il BDNF come biomarker

E' stato ormai dimostrato anche da studi condotti nel nostro laboratorio che nel cervello l'huntingtina normale sostiene la trascrizione genica della neurotrofina BDNF, importante per la sopravvivenza e lo sviluppo dei neuroni striatali che muoiono nella malattia. Numerosi dati evidenziano una riduzione dei livelli di BDNF durante la progressione della malattia: tale

diminuzione è stata dimostrata sia in modelli cellulari di HD (Zuccato e Cattaneo, 2007 review), sia in modelli animali dove si osserva una riduzione del 40-50% dei livelli di BDNF corticale, sia in pazienti HD (Zuccato, 2008).

Sebbene il BDNF sia presente in alte concentrazioni nel sistema nervoso centrale, è stata dimostrata la sua presenza anche in tessuti non neuronali, tra cui il sangue, sia di modelli murini, topo e ratto, sia il sangue umano (Fujimura et al., 2002; Radka et al., 1996; Pan et al., 1998). Il BDNF è espresso nel plasma e nelle cellule del sangue, sintetizzato nei linfociti e nelle piastrine. Inoltre una piccola quantità di BDNF presente nel sangue è rappresentata dal BDNF che attraversa la barriera ematoencefalica. Questi dati hanno sollecitato il via a diversi studi per investigare i livelli di BDNF nel sangue umano con lo scopo di valutare la potenzialità di questa neurotrofina come biomarker di patologia in un tessuto periferico e facilmente accessibile quale il sangue. Un'affidabile quantificazione del BDNF nel sangue umano rappresenterebbe per diverse patologie quali HD, schizofrenia o depressione, un parametro importante per valutare la potenzialità di nuovi agenti terapeutici. L'attività di ricerca svolta durante la prima parte del mio dottorato si è focalizzata sulla messa a punto di metodiche per un'accurata misura di questa neurotrofina nel sangue umano.

COLESTEROLO NEL CERVELLO: LINK CON HD

Nonostante il SNC rappresenti solo il 2% della massa corporea totale nei mammiferi, esso è uno degli organi più ricchi in colesterolo, contenendo da solo il 23% del colesterolo corporeo totale.

Il colesterolo cerebrale è una componente essenziale delle membrane ed è coinvolto in diverse funzioni biologiche quali il trasporto vescicolare, la trasduzione del segnale, la formazione di mielina e nei processi di sinaptogenesi. L'importanza di queste diverse funzioni neuronali che dipendono esclusivamente da una sintesi a livello locale del colesterolo consolida l'ipotesi che disfunzioni a carico della sintesi, del trasporto e dell'eliminazione del colesterolo cerebrale possano contribuire alla patogenesi di diverse malattie neurologiche.

Il colesterolo nel sistema nervoso centrale

Il colesterolo nel cervello è la componente principale delle membrane cellulari, in quanto ne definisce le proprietà biofisiche e, compattando i fosfolipidi, ne influenza la permeabilità. Inoltre, definisce le proprietà funzionali delle proteine intrinseche di membrana quali i canali ionici e le diverse famiglie recettoriali (Burger et al., 2000). Nella membrana, il colesterolo è localizzato soprattutto in micro-domini resistenti ai detergenti, chiamati lipid rafts, i quali sembrano rappresentare la maggiore "piattaforma" per l'inizio, la propagazione ed il mantenimento degli eventi di trasduzione del segnale (Paratcha et al., 2002).

La maggior parte del colesterolo cerebrale è localizzato nella guaina mielinica prodotto in fase post-natale dagli oligodendrociti. Infatti, durante la vita post-natale elevati livelli di colesterolo sono indispensabili per la formazione della guaina mielinica in vivo, e modelli animali che non sono in grado di sintetizzare il colesterolo a livello cerebrale sviluppano atassia e tremori

(Saher et al., 2005). La mielina rappresenta un bulk di colesterolo cerebrale con un'emivita che va da 2 ai 6 mesi e con un lento turnover (Pfrieger and Ungerer, 2011). Contrariamente, il turnover del colesterolo presente negli astrociti e nei neuroni è stimato intorno al 20% ogni giorno (Pfrieger and Ungerer, 2011). Questa diversa emivita è dovuta al ruolo primario del colesterolo cerebrale nel processo di sinaptogenesi e durante il rilascio di neurotrasmettitori (Thiele et al., 2000; Mauch et al., 2001). Le vescicole sinaptiche contengono più colesterolo di qualunque altro organello intracellulare incluso i mitocondri ed il reticolo endoplasmatico (Schmitz et al., 2001). Alti livelli di colesterolo sono richiesti per permettere la formazione e la fusione delle vescicole sinaptiche indipendentemente dal loro contenuto (Huttner et al., 2001) e per l'organizzazione della frazione postsinaptica (Lang et al., 2001) (Figura 5).

Tenendo conto di questi aspetti e del fatto che la maggior parte del colesterolo nel cervello deriva da sintesi in situ, è atteso che le disfunzioni della sintesi, del trasporto e della rimozione del colesterolo possano portare a disfunzioni e malattie del cervello, come la Sindrome di Smith-Lemli-Opitz o la malattia di Niemann-Pick. In altre patologie, come nel caso dell'Alzheimer, vi è un legame tra metabolismo lipidico e formazione di complessi β -amiloidi, anche se i meccanismi alla base non sono ancora del tutto chiari (Valenza e Cattaneo, 2006). Inoltre, un numero elevato di evidenze sperimentali hanno confermato il coinvolgimento dell'alterazione della biosintesi del colesterolo nella patogenesi di HD (Valenza and Cattaneo, 2011).

Il colesterolo nelle malattie neurodegenerative: Sindrome di Smith-Lemli-Opitz e Malattia di Alzheimer

L'individuazione di diverse patologie congenite e sindromi associate a ritardi mentali provocate da alterazione della biosintesi del colesterolo in fase pre-post natale dimostra il ruolo fondamentale della sintesi del colesterolo durante lo sviluppo cerebrale (Porter FD, 2002).

Un difetto nella sintesi del colesterolo è associata alla sindrome Smith-Lemli-Opitz (SLOS) (Tint et al., 1994), un'autosomica recessiva malformazione descritta per la prima volta nel 1964. Il meccanismo molecolare alla base di SLOS è dovuto alla perdita di attività dell'enzima finale coinvolto nella via biosintetica del colesterolo (i.e. 7-dehydroxy-cholesterol reductasi) con conseguente accumulo di 7-dehydroxy-cholesterol e scarsa sintesi di colesterolo (Battaile & Steiner, 2000). Pazienti SLOS sono affetti da ritardo mentale, microcefalia e ritardi nello sviluppo (Porter JA et al., 1996). Diversi studi in modelli vertebrati ed invertebrati hanno evidenziato che il colesterolo è un componente fondamentale per la maturazione dei morfogeni della famiglia di hedgehog e l'alterazioni di questa via di trasduzione del segnale sono stati individuati in cellule derivate da pazienti SLOS (Porter JA et al., 1996).

Studi sulla Malattia di Alzheimer (MA) hanno ulteriormente rafforzato il possibile coinvolgimento del colesterolo nelle malattie neurodegenerative. Il principale meccanismo patogenetico nella MA è la formazione a livello cerebrale di placche extracellulari di beta-amiloidi ($A\beta$) e di neurofibrille intracellulari con conseguente perdita di un sottotipo neuronale (Sennvik et al., 2000). Recenti studi hanno dimostrato che i livelli di colesterolo influenzano la formazione di $A\beta$ (Simons et al., 1998; Ledesma & Dotti, 2006). Il colesterolo si

accumula nelle placche mature nel cervello di pazienti AD e di topi transgenici per APP (Mori et al., 2001), livelli ridotti di colesterolo inibiscono la formazione di A β nei neuroni ippocampali incrementando il taglio non-patologico di APP da parte dell'alpha-secretasi (Kojro et al., 2001). Sebbene i meccanismi molecolari alla base del legame fra alterazione della biosintesi del colesterolo con la MA non sono ancora chiari, queste evidenze sperimentali insieme ad altri dati che individuano come fattori di rischio per la MA elevati livelli plasmatici di colesterolo (Kivipelto et al., 2002) e di ApoE isoform aE4 (Corder et al., 1993) consolidano il coinvolgimento del colesterolo nella patogenesi della MA.

Regolazione dei livelli di colesterolo nel cervello

Il mantenimento dei livelli costanti intracellulari di steroli intracellulari richiede la regolazione fine sia degli enzimi chiave della via biosintetica del colesterolo che dei ricettori per le LDL sulla membrana cellulare. La regolazione principale della via biosintetica del colesterolo agisce sulla trascrizione degli enzimi chiave della sintesi come l'idrossi-metil-glutaril-CoA Reduttasi (HMGCR) – enzima limitante della via.

Questi geni hanno come caratteristica comune quella di essere regolati da una famiglia di fattori di trascrizione chiamati SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins). SREBP 1 e 2 sono le principali isoforme di questa famiglia di fattori di trascrizione che regolano il metabolismo lipidico e del colesterolo.

Queste proteine si trovano, nella forma inattiva, sulla membrana del reticolo endoplasmatico: presentano 2 domini che sporgono verso il citoplasma, uno regolatore (carbossi-terminale) e l'altro trascrizionale (ammino-terminale), uniti tra loro da un corto loop. In seguito ad una minore concentrazione di steroli nelle cellule, SREBP viene trasportato dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi attraverso la proteina SCAP (SREBP-Cleavage Activating Protein), che funziona come una "chaperone protein". Questo trasporto avviene grazie all'interazione del dominio carbossi-terminale di SCAP con il dominio carbossi-terminale di SREBP (regolatore). Nell'apparato di Golgi, la forma attiva della proteina S1P (Site-1 Protease, una proteasi la cui attività è inibita da alti livelli di steroli) taglia il tratto di 30 aminoacidi che unisce le porzioni N- e C-terminale che si trova nel lume del reticolo endoplasmatico. In questo modo, si formano due frammenti legati alla membrana. Dopo il taglio da parte di S1P, ne avviene un secondo da parte della proteina S2P (Site-2 Protease), che produce un frammento amino-terminale di 68 kDa, in grado di entrare nel nucleo. Nel nucleo la forma attiva di SREBP, si lega alla sequenza ottamerica CACCCCAC dell'elemento SRE (Sterol Regulatory Element), che si trova nel promotore dei geni coinvolti nella via di biosintesi del colesterolo, attivandone la trascrizione (Brown e Goldstein, 1999; Horton JD, 2002) (Figura 6). Il meccanismo descritto è finemente controllato: alti livelli di colesterolo e di ossi-steroli (come il 25-idrossi colesterolo) bloccano l'attivazione del fattore di trascrizione, per feedback negativo; in questo modo la cellula evita di sprecare materiale ed energia e non esprime i geni necessari per neosintetizzare il colesterolo.

Alterazione della biosintesi di colesterolo nella Malattia di Huntington

Negli ultimi anni, anomalie a carico della biosintesi e dell'omeostasi del colesterolo sono state identificate nella malattia di Huntington (Valenza e Cattaneo 2006). Le prime evidenze sperimentali risalgono ad uno studio di microarray su cellule striatali immortalizzate di ratto che sovra-esprimono il frammento N-terminale dell'huntingtina mutata sotto il controllo di un promotore inducibile (Sipione et al 2002). Dall'analisi del profilo di espressione genica è emerso che i livelli di RNA messaggeri di geni chiave nella biosintesi del colesterolo e della sintesi degli acidi grassi erano ridotti in presenza della mutazione. Questi geni avevano come caratteristica comune quella di essere regolati dalla famiglia dei fattori di trascrizione SREBPs. Studi successivi, focalizzati allo studio della via biosintetica del colesterolo, hanno confermato che i livelli di mRNA dei geni colesterogenici erano significativamente ridotti nello striato e nella corteccia di un modello murino transgenico HD R6/2, nonché nel tessuto cerebrale post-mortem di pazienti HD e in fibroblasti umani HD (Valenza et al., 2005).

Inoltre, si è dimostrato che l'huntingtina mutata interferisce con l'attività dell'elemento SRE, impedendo a SREBP di modulare l'espressione dei geni coinvolti. In particolare, si è osservato che in presenza di huntingtina mutata, la quantità di SREBP attivo che normalmente dal RER trasloca nel nucleo è diminuita in vitro e in vivo nei campioni HD, così come l'attività dell'elemento SRE, risultando in una minore trascrizione dei geni controllati, tra i quali quelli responsabili della sintesi del colesterolo (Valenza et al., 2005). Il meccanismo attraverso il quale l'huntingtina mutata interferisce con l'attivazione di SREBP non è ancora stato chiarito: l'inibizione potrebbe avere luogo nel RER o nell'apparato di Golgi o durante la traslocazione nel nucleo; è anche possibile che la proteina mutata agisca a livello dei tre siti, portando complessivamente a una riduzione dei livelli nucleari del fattore di trascrizione attivato (figura 6).

Ulteriori studi hanno dimostrato la riduzione dell'attività del HMGCR e dei livelli di alcuni precursori del colesterolo (valutati tramite spettrometria di massa con diluizione isotopica) nel cervello di topi transgenici sovra-esprimenti sia la porzione N-terminale che la forma intera dell'htt mutata. Un dato importante emerso da questi studi è che in entrambi i modelli animali queste riduzioni compaiono prima dell'insorgenza e la manifestazione dei sintomi (Valenza et al 2007a; Valenza et al. 2007b). Recentemente la biosintesi del colesterolo è risultata essere ridotta anche in altri modelli animali HD, tra cui modelli murini knock-in e ratti transgenici per la mutazione (Valenza et al 2010). In particolare, questo fenotipo peggiora in topi transgenici esprimenti htt umana con un numero progressivamente maggiore di triplette CAG (Valenza et al 2010).

Le evidenze sopra descritte hanno proposto che la disfunzione della biosintesi del colesterolo fosse collegata all'acquisto di una nuova funzione tossica dell'huntingtina mutata che determina un'alterazione del metabolismo del colesterolo (Sipione et al., 2002; Valenza et al., 2005; Valenza et al., 2007; Valenza et al., 2010). Nonostante ciò, modelli murini sovra-esprimenti huntingtina sana mostrano un aumento dell'attività dell'HMGCoA-R e dei livelli di precursori di colesterolo (Valenza et al., 2007), suggerendo un coinvolgimento dell'huntingtina nella biosintesi del colesterolo. Uno studio condotto da Futter e collaboratori ha recentemente mostrato che la sovra-espressione di huntingtina in vitro è in grado di attivare la trascrizione

del recettore nucleare LXR, coinvolto nella regolazione dell'efflusso di colesterolo, mentre il knock-out della proteina ne riduce i livelli di espressione (Futter et al., 2009). In maniera simile, il knock-down funzionale dell'huntingtina durante lo sviluppo embrionale di Zebrafish risulta in una diminuita espressione dei geni regolati da LXR (Diekmann et al., 2009). Al contrario, i livelli di mRNA dei geni coinvolti nell'efflusso e nella biosintesi del colesterolo sono aumentati negli astrociti primari del modello murino transgenico YAC 18 sovra-esprimente huntingtina sana, non solo rispetto agli animali transgenici con 128 CAG, ma anche rispetto ai controlli (Valenza et al., 2010).

Anche se preliminari, questi dati suggeriscono che l'huntingtina potrebbe essere coinvolta nella regolazione dell'omeostasi del colesterolo attraverso la via biosintetica e catabolica, modulando la trascrizione dei geni coinvolti nella biosintesi e nell'efflusso del colesterolo. Rimane da chiarire se l'huntingtina abbia un ruolo preciso nella biosintesi del colesterolo durante lo sviluppo e nel cervello adulto, o vi sia un suo contributo associato a SREBP o LXR. Ulteriori studi sono quindi necessari a chiarire il ruolo dell'huntingtina nella biosintesi del colesterolo e quale implicazione abbia nell'omeostasi del colesterolo.

Componenti cellulari coinvolti nella biosintesi del Colesterolo nel cervello

Come precedentemente evidenziato, il colesterolo cerebrale non deriva dai distretti periferici ma è sintetizzato localmente dalle cellule del cervello (neuroni e glia) ed il contributo di ogni componente cellulare alla sintesi di colesterolo varia con il progredire dello sviluppo (Dietschy and Turley, 2004).

Durante lo sviluppo e la maturazione del sistema nervoso centrale, e prima del differenziamento degli astrociti, i neuroni provvedono autonomamente alla sintesi del colesterolo necessario allo svolgimento delle loro funzioni. Durante il periodo post-natale e nella vita adulta, tuttavia, le funzioni neuronali dipendenti dal colesterolo, quali la formazione ed il mantenimento delle sinapsi, la crescita e l'arborizzazione neuritica, sono strettamente dipendenti dal trasporto di colesterolo da parte degli astrociti tramite la lipoproteina ApoE (Mauch et al., 2001; Ballas et al., 2009). Poichè il colesterolo cerebrale è un componente essenziale delle membrane neuronali e delle guaine mieliniche ed è coinvolto in numerose attività quali il rimodellamento della membrana, la trasduzione del segnale, la produzione di mielina, la sinaptogenesi ed il rilascio di neurotrasmettitori (Wasser and Kavalali, 2009; Valenza and Cattaneo 2011; Pfrieger and Ungerer, 2011), il metabolismo cerebrale del colesterolo rappresenta la chiave per una corretta funzionalità neuronale e alterazione a carico del metabolismo del colesterolo possono influenzarne negativamente la funzionalità.

Il colesterolo che si accumula nel cervello in età postnatale viene trattenuto per molti anni e rappresenta il 70% del colesterolo nei rivestimenti mielinici del cervello adulto. Nell'uomo, il tasso di turnover degli steroli nel cervello è dello 0,03% contro lo 0,7% del corpo intero (Xie et al., 2003); di conseguenza la sua emivita è stimata essere di circa 5 anni (Björkhem et al., 1998). Nei neuroni, ha luogo un normale catabolismo del colesterolo; per mantenere costante il livello di colesterolo totale, gli astrociti devono quindi provvedere alla sua neosintesi. Al fine di mantenere intatto il pool di colesterolo nel SNC, i neuroni e gli astrociti devono

“comunicare” tra di loro. L’enzima 24-colesterol-idrossilasi, un enzima specifico-neuronale della famiglia dei citocromi P450, codificata dal gene Cyp46, è responsabile della degradazione del colesterolo nei neuroni: esso converte il colesterolo nel più polare 24-S-idrossi-colesterolo, il quale è in grado di passare la BEE (Barriera Emato Encefalica), di riversarsi quindi nel sangue (Lutjohann et al., 1996), dove i livelli di questo sterolo possono rappresentare un marcatore periferico del catabolismo del colesterolo cerebrale (Valenza e Cattaneo, 2006; Leoni et al., 2008; Leoni et al., 2011), e di mantenere un omeostasi costante dei livelli di colesterolo nel cervello. Inoltre, il 24-S-idrossi-Colesterolo rappresenta il segnale di comunicazione tra i neuroni e gli astrociti per la neo-sintesi del colesterolo necessaria ai neuroni adulti per svolgere le loro funzioni (Bjorkhem, 1997). Un incremento di flusso di 24-S-idrossi-colesterolo, da neurone ad astrocita, stimola l’efflusso di colesterolo neosintetizzato dalla cellula gliale per quella neuronale.

Il colesterolo di origine astrocitaria, destinato ai neuroni per lo svolgimento di funzioni quali crescita neuritica o attività sinaptica, viene rilasciato dalle cellule gliali e trasportato da lipoproteine come ApoE, la lipoproteina più abbondante nel cervello. Il colesterolo legato all’ApoE viene successivamente captato, mediante un meccanismo di endocitosi, dal neurone, grazie a recettori di membrana, quali LDL receptor e LDL-receptor-related protein 1 (LRP1) (Pfrieger, 2003): LRP-1, presente sulla membrana del neurone interagisce con l’ApoE, e permette l’internalizzazione del complesso lipoproteico nella cellula; qui, la particella viene “disassemblata” (nel lisosoma) e il colesterolo rilasciato per l’utilizzo (Figura 7).

Tutte queste evidenze supportano l’ipotesi che meccanismi cellulari non autonomi a carico delle cellule gliali possano alterare attività neuronali fondamentali e che la perdita di tali attività, in condizioni patologiche, possa portare alla comparsa di neurodegenerazione.

Il cross-talk Astrociti – Neuroni nella malattia di Huntington

Come detto sopra, il turnover del colesterolo presente nei neuroni è stimato intorno al 20% ogni giorno (Pfrieger and Ungerer, 2011). Quindi giornalmente i neuroni hanno bisogno di colesterolo per formare e mantenere gli assoni, i dendriti e le connessioni sinaptiche, ma la maggior parte del colesterolo di cui necessitano per svolgere queste attività deriva dagli astrociti. Le proteine coinvolte nell’efflusso di colesterolo dagli astrociti hanno un ruolo chiave in questo meccanismo che coinvolge astrociti e neuroni (i primi coinvolti nella produzione, gli altri nell’utilizzo di colesterolo).

Come spiegato nel paragrafo precedente, il 24-S-idrossi-colesterolo rappresenta il sensore utilizzato dagli astrociti per promuovere la sintesi ed il rilascio delle particelle lipoproteiche, cariche di colesterolo (Abildayeva et al., 2006). L’apolipoproteina maggiormente rappresentata in queste particelle è l’ApoE, la cui espressione è promossa dal recettore nucleare LXR (Liver-X-Receptor). È importante osservare che il 24-idrossi-colesterolo agisce come un potente attivatore del LXR (Bjorkhem, 1997); questo fattore di trascrizione promuove anche l’espressione della proteina di membrana ABC-A1 (ATP binding Cassette A1), la quale regola l’efflusso di colesterolo attraverso la membrana dell’astrocita (Repa et al., 2000). Questa classe di trasportatori, situati a livello della membrana plasmatica, sfrutta l’energia ricavata

dall'idrolisi dell'ATP per traslocare il colesterolo neosintetizzato fuori dalla cellula; le proteine ABC rilasciano il colesterolo dalla cellula alle HDL, particelle lipoproteiche ad alta densità. Sebbene questo meccanismo, nel SNC, non è stato ancora del tutto chiarito, è probabile che il 24-S-idrossi-colesterolo sia un segnale importante per l'efflusso di colesterolo dall'astrocita, verso il neurone.

Sulla base di queste evidenze e di altri studi presenti in letteratura sta emergendo sempre di più l'importanza del coinvolgimento degli astrociti nelle patologie neurodegenerative, incluso l'HD.

Nei pazienti HD e in modelli animali di malattia i neuroni striatali e corticali degenerano causando disfunzioni motorie e cognitive. La trasmissione sinaptica in tali neuroni viene alterata progressivamente nel corso della malattia (Smith and Brundin, 2005). Inoltre, topi HD mostrano un'anomala comunicazione tra corteccia e striato e all'interno dello stesso striato. In questi topi disfunzioni a livello sinaptico si presentano anche in assenza di un'evidente neurodegenerazione e morte neuronale (Cummings et al. 2010). Gli astrociti rivestono un ruolo chiave nella regolazione sinaptica, dunque difetti nella biosintesi e nell'efflusso del colesterolo in cellule gliali nell'HD potrebbero compromettere numerose attività neuronali dipendenti dal colesterolo. I livelli di RNA messaggero di geni della biosintesi del colesterolo sono ridotti in astrociti primari derivati da due diversi modelli murini HD rispetto ai controlli (Valenza et al., 2010), suggerendo che la presenza di huntingtina mutata causa una riduzione della sintesi di colesterolo nel tipo cellulare che principalmente è deputato a tale funzione nel cervello. Gli astrociti primari HD mostrano anche una riduzione dei livelli di RNA messaggeri di *abca1*, *abcg4* (un altro "ATP-binding cassette transporter" molto espresso nel cervello), e *apoE* rispetto ai controlli e rispetto ad astrociti sovra-espressanti l'huntingtina sana, causando una ridotta produzione e un ridotto rilascio di ApoE nel terreno di coltura (Valenza et al 2010). Inoltre ApoE nel liquido cerebrospinale di topi HD si trova associata a particelle lipoproteiche di dimensioni più piccole rispetto a quelle osservate normalmente nei topi normali, suggerendo che le lipoproteine contenenti ApoE circolanti nel cervello HD sono meno lipidate, cioè trasportano meno colesterolo (Valenza 2010). In accordo, in un modello animale HD, il contenuto di steroli in sinaptosomi isolati è ridotto rispetto ai controlli (Valenza et al 2010). Verosimilmente queste alterazioni potrebbero contribuire alle disfunzioni sinaptiche descritte negli animali HD. Infine l'aggiunta di colesterolo esogeno a neuroni striatali che esprimono l'htt mutata sembra prevenire la loro morte in modo dose dipendente e in maniera simile all'aggiunta di BDNF (Valenza et al., 2005), suggerendo che strategie mirate ad aumentare i livelli di colesterolo nei neuroni potrebbero essere di beneficio per la patogenesi e progressione della malattia.

La seconda parte del mio progetto di dottorato è volta a scoprire se la riduzione della biosintesi di colesterolo e il ridotto rilascio e trasporto di APOE dagli astrociti HD ai neuroni in presenza dell'huntingtina mutata possa rappresentare il meccanismo chiave dell'alterazione del metabolismo nel HD contribuendo in modo significativo alla disfunzioni delle attività neuronale colesterolo dipendente.

Parte I: Marcatori periferici di malattia: Il caso del BDNF nel paziente Huntington e lo sviluppo di nuove strategie per la sua detezione

Il BDNF è una neurotrofina fondamentale per la sopravvivenza dei neuroni striatali, la popolazione cellulare maggiormente colpita nei pazienti Huntington. Nei soggetti affetti da tale patologia si osservano difetti nella trascrizione del gene codificante per tale proteina e nel trasporto della neurotrofina lungo la via cortico-striatale.

Sebbene il BDNF sia molto concentrato nel sistema nervoso centrale, esso risulta rilevabile anche in tessuti periferici tra cui il sangue (Fujimura et al., 2002; Radka et al., 1996). Il BDNF presente in questo distretto viene prevalentemente rilasciato dalle cellule mononucleate del sangue, dalle cellule endoteliali dei vasi ematici e dalle piastrine, mentre in piccola parte deriva dal superamento della barriera emato-encefalica (Nakahashi et al., 2000; Fujimura et al., 2002). Nonostante non sia chiaro come l'espressione e il metabolismo del BDNF periferico siano regolati, è stato dimostrato che i cambiamenti dei livelli di BDNF nel siero di ratto sono correlabili con quelli riscontrati a livello centrale durante lo sviluppo (Karege et al., 2002).

Sulla base di queste osservazioni e della riduzione dei livelli di BDNF riscontrata nel cervello di pazienti Huntington, si è ipotizzato che il BDNF potesse essere un marcatore periferico della malattia.

Studi preclinici su modelli murini in cui sono stati valutati i livelli di BDNF proteina e messaggero in condizioni basali e dopo trattamenti farmacologici sono risultati promettenti (Borrel-Pages et al., 2006; Conforti et al., 2008). In particolare si è osservato che i livelli di RNA messaggero del BDNF nel sangue possono essere sistematicamente monitorati e messi in correlazione con la progressione della malattia in modelli animali Huntington (topi R6/2 e ratti Huntington). Tali livelli sono anche risultati sensibili a trattamenti farmacologici. Trattamenti acuti e cronici di topi R6/2 con CEP-1347, un inibitore della *mixed liniare kinase* (MLK) con effetti neuroprotettivi e neurotrofici, hanno mostrato un incremento dei livelli di BDNF messaggero nel sangue e nel cervello di topi trattati rispetto a R6/2 non trattati (Conforti et al., 2008). Inoltre, in topi R6/1 e topi knock-in la somministrazione di cisteamina determina un incremento dei livelli di BDNF nel cervello e nel siero (Borrel-Pages et al., 2006).

Questi studi supportano l'idea che la capacità di nuovi principi attivi di incrementare i livelli di BDNF in modelli animali possa essere valutata mediante un esame del sangue. Uno studio preliminare pubblicato nel 2007 dal Dott. Ciammola del *Dipartimento di Neurologia, Dino Ferrari, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano*, ha evidenziato come i livelli di proteina del BDNF nel siero di un piccolo gruppo di pazienti Huntington siano significativamente più bassi dei livelli di neurotrofina riscontrati nel siero di soggetti controllo (Ciammola et al., 2007). Nonostante questi risultati incoraggianti, studi in letteratura indicano come il rilevamento della proteina del BDNF nel sangue umano sia un processo complesso che risente di molte variabili (Trajkovska et al., 2007). In letteratura sono presenti numerosi lavori che rivolgono l'attenzione al BDNF nel sangue (intero, plasma e siero), poichè variazioni nei livelli di questa neurotrofina sono state riscontrate in molteplici malattie come Alzheimer (Laske et al., 2005; 2006; Leyhe et al., 2007), schizofrenia (Grillo et al., 2006; Ikeda et al., 2007), depressione (Karege et al., 2001; 2005; Piccinni et al., 2007; Matrisciano et al., 2008), disturbi

dell'alimentazione (Monteleone et al., 2004; Han et al., 2008). I risultati si sono però spesso dimostrati contrastanti in funzione del tipo di campione analizzato (sangue intero, plasma, siero), in funzione delle metodiche di raccolta, di conservazione e di analisi utilizzate.

Sono quindi necessari altri studi per valutare l'attendibilità della misura del BDNF, messaggero e proteina, come marcatore periferico di patologia. La misura del BDNF in campioni umani, specialmente per quel che riguarda la proteina, presenta numerose problematiche legate alla raccolta, alla conservazione ed alla manipolazione da parte dell'operatore del campione in esame (Trajkovska et al., 2007). Se si considera invece l'analisi del messaggero del BDNF, l'utilizzo del *PAXgene™ Blood RNA System* (PreAnalytiX, QIAGEN) permette di standardizzare il processo di raccolta e conservazione del campione tramite la presenza di uno stabilizzatore del RNA cellulare che non altera la successiva estrazione del RNA messaggero. Tali considerazioni evidenziano la necessità di sviluppare un protocollo affidabile di raccolta e processamento sistematico dei campioni in esame, problematica ampiamente affrontata in questo elaborato di tesi.

SCOPO

Sulla base di esperimenti condotti nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato che hanno dimostrato: i) la capacità dell'huntingtina normale di sostenere nel cervello la trascrizione genica del BDNF (Zuccato et al., 2001; Zuccato et al., 2007); ii) una ridotta attività trascrizionale del gene del BDNF in cellule e in modelli animali esprimenti la proteina huntingtina mutata (Zuccato & Cattaneo, 2007); iii) una riduzione dei livelli di RNA messaggero del BDNF in corteccia e striato di pazienti affetti dalla Malattia di Huntington (Zuccato et al., 2008), iv) una riduzione dei livelli di BDNF messaggero nel sangue di topi Huntington durante la progressione della patologia, correlabile al decremento di messaggero del BDNF riscontrabile nella corteccia cerebrale degli stessi animali (Conforti et al., 2008), si è ipotizzato che i livelli di BDNF, messaggero e proteina, nel sangue periferico umano potesse riflettere i livelli della suddetta neurotrofina nel cervello di pazienti Huntington, e che, la quantificazione del BDNF messaggero nel sangue possa essere indicativa dello stadio e della progressione della malattia.

Scopo di questa tesi è stato quello di analizzare i livelli di BDNF in campioni di sangue periferico di pazienti affetti dalla Malattia di Huntington e in soggetti controllo, per valutare:

1. la riproducibilità delle misure del BDNF proteina e messaggero
2. la possibilità che i livelli del BDNF nel sangue costituiscano un marcatore periferico di malattia.

RISULTATI**ANALISI DEL BDNF PROTEINA NEI PAZIENTI HD****Misure dei livelli di BDNF proteina nel plasma dei pazienti HD**

Da una prima analisi della letteratura è emerso una variabilità dei livelli fisiologici del BDNF nel plasma di soggetti controllo probabilmente causata da differenze nelle procedure di raccolta e preparazione dei campioni di analisi. Questa osservazione ci ha portato ad effettuare una misura preliminare dei livelli di BDNF in campioni di plasma preparati dopo 1 ora, 4 ore, e 24 ore dal prelievo. L'analisi tramite saggio ELISA ha evidenziato che i livelli di BDNF nei campioni di plasma preparati dopo 1 ora del prelievo e di 462.4 ng/ml, una quantità molto inferiore ai livelli di BDNF nei campioni di plasma preparati dopo 4 ore dal prelievo (1462.1 ng/ml). Nessuna differenza è stata invece misurata tra i livelli di BDNF presenti nel plasma preparato dopo 4 ore (1462.1 ng/ml) o 24 ore (1662.4 ng/ml) dal prelievo (figura 8A) La possibile causa dell'incremento dei livelli di BDNF nel plasma preparato dopo 4 e 24 ore dal prelievo può essere attribuita alla degranolazione piastrinica (Fujimura et al., 2002). Nel sangue, infatti, il BDNF circolante viene accumulato nelle piastrine, in seguito allo stress del prelievo e dell'ago si osserva il processo di degranolazione piastrinica, le piastrine si attivano e rilasciano il loro contenuto compreso il BDNF (Fujimura et al., 2002). Il rilascio di BDNF da parte delle piastrine sembra quindi proporzionato al tempo trascorso dal prelievo alla preparazione del plasma, I livelli di BDNF raggiungono un valore massimo a 4 ore e rimangono costanti fino a 24 ore.

Inseguito a questo esperimento preliminare, abbiamo deciso di rivolgerci alla Blood Bank del Henry Mondor Hospital di Creteil (Gruppo Francese, tabella 1) per le misure del BDNF proteina nel plasma, in modo da ottenere un numero di campioni statisticamente significativo e di ridurre al minimo la variabilità inter-campione dovuta alle procedure di raccolta e preparazione del campione stesso. I campioni ottenuti dalla banca Francese ed analizzati in questa prima analisi comprendono 40 pazienti HD, 4 soggetti pre-HD e 22 controlli. Il plasma di questi campioni è stato preparato dopo 4 ore dal prelievo, e questo giustifica i livelli elevati di BDNF misurati (figura 8B). Ancora più importate notare dalla figura 8B l'aumento statisticamente significativo dei livelli di BDNF nel plasma dei pazienti a stadi precoci, intermedi ed avanzati della malattia rispetto ai soggetti sani; dai valori di mediana inoltre si osserva che i livelli di BDNF nel plasma dei pazienti HD incrementano con il progredire della patologia anche se l'aumento tra i diversi stadi della malattia non è statisticamente significativo. Infatti, non abbiamo trovato alcuna correlazione tra il contenuto plasmatico di BDNF e la progressione della malattia misurata tramite la scala di valutazione motoria UHDRS e mediante il punteggio TFC o la lunghezza del CAG.

Per confermare ulteriormente l'incremento dei livelli plasmatici del BDNF nei pazienti HD abbiamo voluta aumentare il numero di campioni esaminati nello studio. Abbiamo ottenuto campioni di plasma da una seconda banca dell'University College London (UCL, Gruppo Inglese A, tabella 1) che comprendevano 30 controlli, 22 soggetti preHD e 65 pazienti HD. Nonostante i campioni arrivassero da due Banche di raccolta, le procedure di prelievo e preparazione del plasma si sono rivelate differenti. La banca dell'UCL effettuava il prelievo a condizioni di non digiuno, a differenza della banca francese che prelevava il sangue dai soggetti mantenuti a digiuno dalla sera prima, ed ancora più importante la banca di UCL preparava il plasma dopo 2 ore dal prelievo, non dopo 4 ore come la banca Francese. Per le motivazioni sopra discusse, i livelli di BDNF nel plasma dei campioni controllo del Gruppo Inglese sono notevolmente inferiori (0.8 ng/ml) (figura 8C) rispetto ai livelli misurati nel plasma dei soggetti controllo del Gruppo Francese (3.8 ng/ml) (Figura 8B). Inoltre, questa divergenza nei valori assoluti, non ha reso possibile l'analisi dei campioni provenienti dalle due banche in un unico esperimento, abbiamo quindi analizzato i 2 gruppi separatamente.

Dall'analisi dei livelli plasmatici di BDNF nel Gruppo Inglese A non è emersa nessuna riduzione statisticamente significativa nei pazienti HD rispetto ai controlli (figura 8C), risultato contrastante rispetto al dato ottenuto dall'analisi del Gruppo Francese (figura 8B). In conclusione i dati sopra discussi mostrano come soggetti controllo e HD provenienti da due diversi Gruppi mostrano un comportamento opposto nei livelli plasmatici del BDNF. Questo può essere dovuto alle diverse procedure eseguite dalle banche nella fase di reclutamento e preparazione dei campioni così come dalla variabilità intra-gruppo, il BDNF infatti è influenzato da svariati fattori quali l'età, il sesso e la dieta (Mitoma et al., 2008; Lommatzsch et al., 2005; Zuccato and Cattaneo, 2007).

Misure dei livelli di BDNF proteina nel siero dei pazienti HD

In seguito ai dati contrastanti ottenuti dalla misura del BDNF nel plasma, abbiamo deciso di provare a misurare i livelli di BDNF nel siero dei soggetti sani e HD. Infatti, in uno studio recente, i Dottori Andrea Ciammola (AC) e Jenny Sassone (JS), avevano mostrato una diminuzione dei livelli di BDNF nel siero di 29 pazienti Huntington (Ciammola et al., 2007) dimostrando quindi la possibilità di misurare in modo riproducibile i livelli di BDNF nel siero. Abbiamo quindi ottenuto da AC e JS un numero adeguato di campioni (nuovi e anche già analizzati nel loro studio) per vedere se eravamo in grado di ripetere l'analisi.

La prima analisi, effettuata sui campioni del Gruppo Italiano A (tabella 1) composto da 30 controllo, 4 soggetti pre-HD e 22 pazienti HD, non ha mostrato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di BDNF nel siero dei pazienti HD rispetto ai controlli (mediana dei livelli di BDNF nel siero dei controlli era 13.4 ng/ml contro la mediana di 11.1 ng/ml dei pazienti HD) (Figura 9A). A distanza di 6 giorni, abbiamo effettuato una seconda analisi sul Gruppo Italiano A (aliquota nuova mai soggetta a stadi di congelamento/scongelo) con il medesimo kit ELISA, l'esperimento conferma l'assenza di una riduzione del BDNF nel siero dei pazienti HD (Figura 9A), ma ancora più importante evidenzia l'elevata variabilità della misura dei livelli del BDNF nel siero degli stessi campioni (mediana dei livelli di BDNF nel siero dei controlli 2 analisi 10.5

ng/ml, mediana dei pazienti HD 2 analisi 8.4 ng/ml) (figura 9A-B). Abbiamo calcolato che 16 di 30 controlli e 20 di 22 pazienti HD mostrano una misura significativamente diversa (<15%) tra la prima e la seconda analisi. Questi dati suggeriscono di affrontare con molta cautela le misure dei livelli di BDNF in siero e di interpretarle correttamente a causa dell'elevata variabilità inter-analisi. In parallelo, abbiamo analizzato I campioni del Gruppo Italiano B, raccolti dal Istituto Neurologico Nazionale "Carlo Besta" di Milano, composti da 7 controlli e 7 pazienti HD. Anche in questo caso non abbiamo osservato nessuna riduzione dei livelli di BDNF nei pazienti HD (figura 9C).

Come ulteriore prova, abbiamo deciso di misurare contemporaneamente tutti i campioni dei Gruppi Italiani A e B in doppio. L'esperimento è stato condotto in parallelo da 2 operatori che hanno misurato la stessa aliquota di campione (aliquota nuova mai soggetta a stadi di congelamento/scongelamento) con lo stesso kit ELISA (stessi controlli e curve standard) per cercare di ridurre al minimo l'influenza della variabilità inter-analisi. Come mostrato dalla figura 9D i due operatori non hanno trovato nessuna variazione del contenuto del BDNF nel siero tra controlli e pazienti HD e la variabilità tra le due misure rimane sempre elevata. Inoltre I valori di BDNF nel siero risultano ancora più bassi dai valori ottenuti dalla prima e seconda analisi (figura 9A-B-D) suggerendo che la condizione di conservazione dei campioni a -80°C possono influire sulla stabilità del siero.

Questi dati nell'insieme evidenziano l'elevata difficoltà di misura del BDNF nel siero e suggeriscono di affrontare queste analisi con estrema cautela soprattutto nell'interpretazione dei dati. Inoltre, contrariamente ai dati presenti in letteratura (Ciammola et al., 2007), non abbiamo osservato nessuna differenza nel contenuto di BDNF nel siero tra la popolazione controllo ed i pazienti HD.

QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI BDNF MESSAGGERO NEI PAZIENTI HD

I dati sopra discussi evidenziano che le analisi sui livelli di BDNF proteina nel sangue e nel siero dei pazienti HD rappresentano una misura non facilmente riproducibile ed affidabile. Basandoci su queste osservazioni e sulle evidenze già pubblicate relative alla riduzione del BDNF corticale nel cervello di soggetti affetti dalla malattia di Huntington rispetto ad individui sani (Zuccato et al., 2008), agli studi preclinici che hanno evidenziato una progressiva riduzione dei livelli di BDNF messaggero nel sangue di roditori HD (Conforti *et al.*, 2008) ed alla rilevabilità del BDNF messaggero nel sangue intero periferico umano (figura 10), abbiamo deciso di condurre un'analisi per misurare i livelli di messaggero del BDNF nel sangue periferico umano, al fine di valutarne il possibile utilizzo come marcatore biologico per la Malattia di Huntington.

Variabilità dei livelli di BDNF nel sangue umano: il problema dei "Reference genes"

In una prima serie di esperimenti abbiamo quantificato, mediante PCR quantitativa Real-time (qPCR), il BDNF messaggero nel sangue dei campioni del Gruppo Inglese B composto da 8 soggetti sani, 10 individui pre-sintomatici e 22 pazienti Huntington. I campioni di sangue sono

stati prelevati mediante l'utilizzo di PAXgene™ Blood RNA Tube e conservati a -20°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA totale. I livelli di RNA messaggero del BDNF sono stati normalizzati sui livelli di messaggero del GAPDH (Glyceraldehyde-3-Oxidoreductase phosphate dehydrogenase), un "*reference gene*" costitutivamente espresso che consente di correggere le differenze qualitative e quantitative dei cDNA utilizzati come stampo nella reazione di PCR (Bustin et al., 2000; Suzuki et al., 2000). I risultati di tali esperimenti indicano la presenza di una differenza statisticamente significativa tra i livelli di RNA messaggero del BDNF totale dei pazienti Huntington e dei soggetti sani. La differenza tra i livelli di RNA messaggero del BDNF in soggetti controllo e pre-sintomatici non è invece significativa dal punto di vista statistico (figura 11A). In letteratura è riportato che l'utilizzo del GAPDH come "*reference gene*" per le analisi d'espressione genica nel sangue non garantisce una quantificazione attendibile, a causa della sua alta variabilità d'espressione (Dheda et al., 2004). Per questo motivo abbiamo deciso di normalizzare il contenuto di RNA messaggero del BDNF degli stessi campioni precedentemente analizzati su un altro "*reference gene*", la $\beta 2$ -microglobulina, presentato in letteratura come uno dei geni controllo più stabili in sangue umano (Zhang et al., 2005). I risultati ottenuti indicano l'assenza di una differenza statisticamente significativa tra i livelli di BDNF messaggero nel sangue di soggetti controllo, pre-sintomatici e di pazienti con malattia conclamata (figura 11B). I diversi livelli di messaggero del BDNF misurati nei nostri campioni di sangue (valori di mediana nei soggetti controllo: BDNF mRNA/GAPDH mRNA: 1; BDNF mRNA/ $\beta 2\text{M}$ mRNA: 1.6) potrebbero derivare da diversi fattori che possono inficiare una quantificazione affidabile dei livelli di mRNA in un'analisi d'espressione genica effettuata in campioni biologici di origine umana: la raccolta dei campioni, la loro manipolazione e conservazione, la variabilità della quantità e della qualità dell'RNA retrotrascritto e del cDNA amplificato. Nel nostro caso, l'utilizzo dei PAX gene RNA Tube per la raccolta del sangue periferico intero, garantisce la conservazione dei campioni per lunghi periodi di tempo (mesi) e la stabilità dell'RNA. E' quindi molto probabile che le discrepanze osservate nelle analisi quantitative degli RNA messaggeri dipendano da un impreciso processo di normalizzazione (Bustin et al., 2002).

Questi esperimenti portano quindi alla luce una problematica già ampiamente affrontata in letteratura (Vandesompele et al., 2002) sulla poca affidabilità della normalizzazione su singolo gene controllo per le analisi di messaggeri in Real Time PCR, anche se questo risulta essere il metodo ad oggi maggiormente utilizzato per la quantificazione degli RNA messaggeri in qPCR.

Individuazione di una nuova strategia di normalizzazione per le analisi in Real Time PCR: le *EAR repeats*

Fin dal 2000 numerosi articoli si sono occupati delle problematiche correlate agli errori nella quantificazione in Real time PCR dovuti ad un'erronea normalizzazione dei dati ed hanno dimostrato come molti dei geni considerati come geni controllo, GAPDH o βACT , in realtà mostrano alterazione della loro espressione genica in determinate condizioni sperimentali (Bustin et al., 2000 and 2002). L'affidabilità del "*reference gene*" per un'adeguata normalizzazione è un punto chiave per la robustezza e la riproducibilità dei dati. I dati sopra

descritti confermano ulteriormente questa evidenza dimostrando come la normalizzazione basata su un singolo gene controllo possa dare origine ad una quantificazione errata del gene target.

Alla luce di queste problematiche, durante il mio primo anno di dottorato mi sono occupata di sviluppare un nuovo e robusto metodo di normalizzazione per gli studi di espressione genica in qPCR. Un metodo per normalizzare l'espressione di geni specifici più accurato e affidabile di quello che prevede l'utilizzo di un singolo "reference gene" è stato proposto nel 2002 da Vandesompele e colleghi del *Center for Medical Genetics of Ghent University* in Belgio. Tale metodo consiste in un algoritmo, GeNorm, che fornisce per un gruppo di 6-15 "reference genes" una scala di stabilità (M = stabilità di espressione del gene controllo) entro uno specifico tessuto e sulla base di tale scala viene calcolato un fattore di normalizzazione (NF) da utilizzare nell'analisi d'espressione, che nasce dalla media geometrica dei livelli di RNA messaggero di almeno 3 dei geni più stabili.

Nonostante la sua validità come metodo di normalizzazione, il ricorso a GeNorm comporta l'utilizzo di ingenti quantità di campione: devono infatti essere amplificati mediante Real-time PCR almeno 6 "reference genes" al fine di definire quelli più stabili entro il tessuto che si sta analizzando. Questo determina spese elevate legate al consumo di ingenti quantità di reattivi. Inoltre, la ricerca di geni controllo la cui espressione risulti stabile, diventa particolarmente difficoltosa quando si lavora su campioni prelevati da soggetti affetti da patologie caratterizzate da disregolazione trascrizionale, di cui la Malattia di Huntington è un esempio (Cha et al., 2007). L'alterazione dell'attività dei fattori di trascrizione o l'alterazione delle sequenze di DNA bersaglio di tali fattori possono inficiare anche i livelli di RNA messaggero dei "reference genes", aumentando così la possibilità di errori nella valutazione dei livelli d'espressione del gene d'interesse.

Nella ricerca di una nuova strategia di normalizzazione, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulle sequenze EAR (*Expressed ALU Repeats*). Le sequenze EAR sono porzioni di DNA costituite da circa 300 paia di basi altamente ripetute nel genoma umano (circa un milione di copie), divise in 30 sottofamiglie altamente conservate (Batzer et al., 2002). Più del 75% dei geni umani contiene delle sequenze EAR all'interno dei propri introni e/o delle regioni non codificanti UTRs (*untranslated regions*). Per questo motivo la probabilità che una disregolazione trascrizionale e/o una stimolazione di origine fisiologica o patologica influenzino l'abbondanza delle sequenze EAR nel trascrittoma è molto bassa. Da qui l'idea di utilizzare i livelli di espressione delle EAR come sistema di normalizzazione dei dati di espressione genica in qPCR.

Per prima cosa è stato sviluppato un protocollo di amplificazione che permettesse di lavorare in condizioni ottimali di qPCR come è possibile osservare dall'efficienza di PCR (102%) e dal valore del coefficiente angolare della retta (-3.27) (figura 12A) lavorando con pochissimo materiale di partenza, ho infatti effettuato una retrotrascrizione di 250ng di RNA e ho diluito il cDNA ottenuto 1:200. La limitata quantità di materiale necessaria per l'analisi è sicuramente un importante vantaggio di questa nuova strategia di normalizzazione. Un aspetto importante è rappresentato dall'analisi del prodotto di amplificazione tramite la curva di Melting. La curva di Melting ottenuta a fine dell'analisi mostra più picchi rispetto all'unico picco dato dal prodotto

di amplificazione atteso (figura 12B). Questa atipica curva di Melting è dovuta ai polimorfismi presenti nelle diverse sottofamiglie in cui le sequenze ripetute EAR sono suddivise quindi le diverse curve di melting per diversi campioni sono attese anche se ogni singolo campione deve avere la stessa curva di melting nei diversi replicati di qPCR.

Validazione delle sequenze EAR come metodo accurate di normalizzazione per analisi di qPCR nel sangue umano

Poichè, l'utilizzo di un fattore di normalizzazione (NF) ottenuto tramite GeNorm dalla media geometrica di almeno 3 dei "*reference genes*" più stabili del tessuto analizzato può essere considerato un robusto metodo di normalizzazione (Vandesompele *et al.*, 2002), abbiamo deciso di mettere a confronto il metodo di normalizzazione basato sui livelli di EAR con il metodo di normalizzazione messo a punto da Vandesompele al fine di valutare la validità della strategia da noi proposta.

Per prima cosa abbiamo selezionato un pannello di 6 geni controllo, appartenenti a diverse classi funzionali in modo da ridurre il rischio che tali geni fossero co-regolati o risentissero di disfunzioni trascrizionali dipendenti da una condizione patologica, su cui applicare GeNorm (Marullo *et al.*, 2010). L'analisi con GeNorm ha portato a individuare tre "*reference genes*" più stabili nel sangue umano: GNB2L1, HPRT1 e YWHAZ (Figura 13). Il GAPDH e la β 2-microglobulina, scelti come "*reference genes*" all'inizio del nostro studio, non hanno mostrato livelli d'espressione stabili nel sangue. Questo può spiegare i risultati discrepanti ottenuti nella quantificazione del messaggero del BDNF. Una volta identificati i 3 geni controllo più stabili nel sangue, si è calcolato il fattore di normalizzazione (NF) facendo la media geometrica dei livelli di espressione di tali geni.

Per validare il metodo di normalizzazione da noi proposto, abbiamo confrontato i livelli di BDNF messaggero normalizzati sulle sequenze EAR e su NF in 10 soggetti controllo appartenenti al Gruppo Italiano C. Come è possibile osservare dalla figura 14A i livelli di BDNF quantificati con le due diverse strategie di normalizzazione sono simili, inoltre il Pannello B della figura 14 mostra come i valori di mediana del messaggero del BDNF normalizzato su EAR e NF sono sovrapponibili (BDNF mRNA/EAR 0.95 verso BDNF mRNA/NF 1.1).

Successivamente, abbiamo ripetuto la quantizzazione dei livelli di BDNF mRNA su i primi 8 controlli sani analizzati in figura 14C (Gruppo Inglese B), confrontato i livelli di RNA messaggero del BDNF normalizzati sui livelli di RNA di due singoli "*reference genes*" (GAPDH, β 2-microglobulina) con il nuovo metodo di normalizzazione basato sulle EAR. Dall'analisi è evidente come i livelli di messaggero del BDNF normalizzati sul contenuto di trascritti EAR (valore di mediana 0.55) è diverso dai livelli determinati dalla normalizzazione con un singolo "*reference gene*" (valori mediani del BDNF/GAPDH 1, del del BDNF/ β 2MG 1.6) Questo dato è atteso in quanto i due geni controllo scelti, GAPDH e β 2-microglobulina, non sono stabilmente espressi nel tessuto analizzato. Il risultato più importante emerso da questa analisi è la distribuzione dei livelli di BDNF normalizzati sulle EAR, notevolmente ristretta rispetto alla distribuzione dei livelli di BDNF normalizzati su GAPDH e β 2-microglobulina (figura 14C). Questo indica che la strategia di normalizzazione basata sull'utilizzo dei livelli d'espressione

delle sequenze EAR riduce la variabilità non specifica dovuta ad una normalizzazione basata su un non specifico gene controllo.

Questi esperimenti validano l'applicabilità in PCR quantitativa Real-time del metodo di normalizzazione EAR per la misura dei livelli di messaggero del BDNF nel sangue. Tale metodo consente l'utilizzo di una ridotta quantità di reagenti rispetto alla normalizzazione che utilizza il valore NF ottenuto mediante l'algoritmo GeNorm e diventa particolarmente utile nell'analisi sull'uomo per la ricerca di eventuali *biomarker* nel trascrittoma.

Applicazione del metodo di normalizzazione delle EAR in altri tessuti umani

Per confermare l'affidabilità della strategia di normalizzazione basata sulla quantificazione dei trascritti EAR nel sangue abbiamo valutato l'espressione di un gene specifico di questo tessuto: l'interleuchina 8.

La figura 15A mostra il confronto tra i livelli di RNA messaggero dell'IL8 nel sangue di 10 soggetti sani del Gruppo Italiano C normalizzati sul contenuto dei trascritti EAR e ricorrendo all'NF ottenuto dall'algoritmo GeNorm. L'analisi mostra chiaramente che le due metodiche di normalizzazione sono paragonabili tra loro ed i livelli del messaggero dell'IL-8 normalizzati con le sequenze EAR e con NF sono sovrapponibili (coefficiente di correlazione di Pearson $< 0,0001$). Il valore di mediana dei livelli di mRNA dell'IL-8 normalizzati con il metodo delle EAR (0,28) è infatti molto simile alla mediana dei livelli di mRNA dell'IL-8 normalizzati con NF (0,33) (figura 15B). Da questi dati è possibile concludere che il metodo di normalizzazione che prevede la valutazione dell'espressione delle sequenze EAR nel sangue umano è affidabile anche per la quantificazione dell'RNA messaggero trascritto da altri geni espressi in questo tessuto, come quello della citochina 8.

Un metodo sensibile e accurato di normalizzazione per saggi di qPCR è uno strumento importante non solo per la quantificazione di mRNA specifici presenti in sangue ma anche per la quantificazione di messaggeri presenti in altri tessuti umani.

In uno studio condotto nel 2007 durante il mio periodo di tesi presso questo laboratorio, abbiamo analizzati i livelli di RNA messaggero del BDNF in corteccia di soggetti controllo e di pazienti Huntington. I livelli di BDNF messaggero sono stati normalizzati sul contenuto di RNA messaggero del GAPDH. I risultati ottenuti hanno evidenziato una riduzione statisticamente significativa dei livelli di BDNF messaggero nella corteccia dei pazienti rispetto a quella dei controlli (Zuccato *et al.*, 2008). Avendo a disposizione un metodo di normalizzazione rivelatosi affidabile, sensibile e accurato nel sangue l'idea è stata quella di ripetere le analisi dei livelli di RNA messaggero del BDNF in corteccia cerebrale e normalizzarli sui livelli di RNA messaggero delle sequenze EAR e di confrontare i livelli di messaggero del BDNF normalizzati sul contenuto di trascritti EAR con quelli invece normalizzati sui livelli di messaggero del GAPDH (Zuccato *et al.*, 2008).

Abbiamo deciso di analizzare i livelli di RNA messaggero del BDNF nella corteccia cerebrale di 7 soggetti controllo e 6 pazienti Huntington, già analizzati nello studio precedente (Zuccato *et al.*, 2008). I risultati ottenuti indicano che in corteccia i livelli di BDNF messaggero normalizzati con le sequenze EAR sono confrontabili con i livelli di RNA messaggero del BDNF

normalizzati sul GAPDH (Figura 15C). La normalizzazione dei livelli di RNA messaggero del BDNF sui livelli dei trascritti EAR riproduce il dato presentato nel 2008 dalla dott.ssa Zuccato, ossia la diminuzione dei livelli di BDNF messaggero nella corteccia di pazienti Huntington rispetto alla corteccia di soggetti controllo. Questi dati hanno confermato la validità del metodo di normalizzazione da noi proposto anche in altri tessuti diversi dal sangue.

Quantificazione del BDNF messaggero nel sangue umano

L'individuazione di un metodo di normalizzazione rapido ed efficace ha rappresentato un punto chiave per la validazione del messaggero del BDNF come biomarker per la HD.

Sono stati analizzati 3 diversi gruppi di campioni, il Gruppo Inglese B composto da 6 controlli, 10 preHD e 21 pazienti HD, il Gruppo Inglese C composto da 16 controlli, 11 preHD e 24 pazienti HD e il Gruppo Italiano C composto da 23 controlli, 4 preHD e 25 pazienti HD (tabella 1). La procedura di raccolta dei campioni è stata la medesima in entrambi gli istituti: utilizzo dei PAXgene™ Blood RNA Tube, prelievo tra le 8:30 e le 10 del mattino in condizioni di digiuno e conservazione dei campioni di sangue a -20°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA totale. Come si può osservare nei pannelli A e B della figura 16, le nostre analisi non hanno evidenziato differenze significative dei livelli di BDNF messaggero nel sangue di pazienti HD, soggetti controllo e individui pre-sintomatici tra i campioni del Gruppo Inglese B e C. Inoltre, anche nei campioni provenienti da un diverso centro clinico (Gruppo Italiano C), non si osservano differenze significative dei livelli di BDNF messaggero che consentano di discriminare le tre popolazioni (figura 16C). Da un'analisi complessiva dei risultati ottenuti è inoltre evidente una variabilità dei livelli del trascritto del BDNF nella popolazione controllo, nei pre-sintomatici e nei pazienti Huntington. Questi dati sono stati analizzati anche in riferimento a trattamenti farmacologici con molecole capaci di incrementare, secondo letteratura, i livelli di BDNF (Nestler *et al.*, 2002; Duan *et al.*, 2004). Non abbiamo riscontrato alcuna correlazione significativa tra la terapia e i livelli di neurotrofina.

Validazione di RNA messaggeri precedentemente individuati come biomarker in HD

ANXA1 (*annexin 1*) e ROCK1 (*Rho-associated coiled-coil forming kinases*) sono 2 dei 12 geni la cui espressione nel sangue di pazienti Huntington è stata dichiarata alterata a tal punto da consentire la discriminazione di soggetti sani, pre-sintomatici e malati (Borovecki *et al.*, 2005). Lo studio che ha portato a trovare questi potenziali marcatori biologici di malattia è stato condotto presso il *Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School* sotto la direzione di Dimitri Krainc e ha previsto il coinvolgimento di 53 volontari sani, 9 soggetti pre-sintomatici e 53 pazienti Huntington.

Alla luce dei risultati che indicano che la misura dei livelli di RNA messaggero del BDNF non è considerabile come potenziale marcatore biologico di patologia e alla luce dell'interessante risultato ottenuto dal gruppo di Krainc, abbiamo analizzato i livelli di RNA messaggero dei geni sopra indicati nel sangue del Gruppo Italiano C composto da 10 soggetti sani e di 10 pazienti Huntington, con l'intento di estendere i dati presentati nel 2005. I livelli di messaggero di

ANXA1 e ROCK1 sono stati normalizzati sia col metodo adottato dal gruppo di Krainc, ossia con i livelli di messaggero della β -Actina, sia con il metodo delle EAR.

Dalle analisi da noi condotte si può notare che l'utilizzo delle sequenze EAR consente di ridurre la variabilità dovuta alla scelta di un singolo gene controllo in entrambi i geni target (figura 17A-B), la distribuzione dei livelli di messaggero di ANXA1 e ROCK1 normalizzati sulle sequenze EAR è, infatti, più ridotta rispetto alla distribuzione ottenuta mediante la normalizzazione con β -actina (gene la cui espressione non è stabile nel sangue). Inoltre, non viene riprodotto il dato presentato da Borovecki e colleghi nel 2005. Non si evidenzia, infatti, una differenza significativa nell'espressione di ANXA1 e ROCK1 tra pazienti Huntington e soggetti controllo né ricorrendo alla normalizzazione con la β -Actina né normalizzando con le sequenze EAR.

Queste analisi hanno evidenziato sia l'importanza dell'utilizzo di metodi di normalizzazione robusti e attendibili per evitare errori di quantificazione, sia la difficoltà nel rilevare RNA messaggeri nel sangue da utilizzare come marcatori biologici per la Malattia di Huntington.

DISCUSSIONE

L'insieme dei dati presentati compone lo studio più complesso e rappresentativo sull'analisi dei livelli di BDNF nel sangue umano con il coinvolgimento di 3 diversi centri clinici e 398 campioni analizzati (138 controlli, 56 preHD e 205 pazienti HD). In questo lavoro di tesi abbiamo mostrato che i livelli di BDNF nel sangue dei pazienti HD non sono indicativi dell'insorgenza e della progressione della Malattia di Huntington e quindi questa neurotrofina non può rappresentare un *biomarker* per questa patologia. Inoltre, abbiamo dimostrato che molti dati sui livelli di BDNF proteina nel sangue (ed in particolare nel siero) sono difficilmente riproducibili. La difficoltà nell'ottenere misure robuste e riproducibili dei livelli proteici di BDNF non è un problema limitato alla malattia di HD, ma si estende anche ad altre patologie in cui i livelli di proteina BDNF sono misurati nel siero o nel plasma. Contrariamente alle difficoltà tecniche riscontrate per la misura del BDNF proteina, in questa tesi abbiamo sviluppato un appropriato metodo di normalizzazione per analisi di espressione genica in diversi tessuti umani sangue, cervello e muscolo (Marullo et al., 2010). La messa a punto del metodo di normalizzazione basato sulle sequenze EAR ha permesso di misurare i livelli di BDNF messaggero in un ampio numero di campioni e le analisi svolte evidenziano che i livelli di BDNF messaggero nei pazienti HD non sono ridotti.

Le misure del BDNF proteina nel siero e nel plasma non sono affidabili

Una parte consistente di questo studio è rappresentata dalle analisi per l'ottenimento di una misura stabile e riproducibile della proteina BDNF circolante. Per queste misure sono stati analizzati 91 controlli, 31 soggetti preHD, e 134 pazienti HD. In tutte le analisi condotte, abbiamo riscontrato elevate difficoltà nelle misure del BDNF proteina nel siero e nel plasma dei campioni umani dovute principalmente ad una mancata standardizzazione nelle procedure di reclutamento e raccolta dei campioni. Nello specifico, la variabilità osservata nei livelli di BDNF nel siero, anche solo dei soggetti controllo, rende questa misura proibitiva per future analisi cliniche. Un aspetto critico è rappresentato dalla variabilità intra-gruppo, una delle cause principali della discrepanza osservata nel contenuto di BDNF proteina (Zuccato and Cattaneo, 2007). Questa osservazione riguarda anche il plasma, il primo comparto periferico che abbiamo analizzato. In questo studio abbiamo dimostrato come sia difficile ottenere un risultato replicabile se si misura il contenuto di BDNF in campioni di plasma raccolti da 2 differenti banche. L'ottenimento dei campioni da banche con protocolli di reclutamento e preparazione dei campioni stabiliti non evita quindi il problema metodologico su un'inadeguata accuratezza nella raccolta, preparazione e conservazione del campione. Abbiamo, infatti, dimostrato che la preparazione del plasma dopo 2 ore (Gruppo Inglese A) o 4 ore (Gruppo Francese B) dal prelievo influisce notevolmente sul contenuto plasmatico di BDNF del

campione. Questi risultati evidenziano la necessità di sviluppare una rete di comunicazione tra banche che permetta di uguagliare le procedure di collezionamento dei campioni e di garantire un adeguato numero di campioni per eseguire studi clinici.

Se le problematiche finora discusse riguardano entrambi i compartimenti periferici analizzati in questo studio, plasma e siero, tuttavia le analisi qui discusse e studi precedenti (Yi et al., 2008) hanno dimostrato che il plasma è più stabile del siero e quindi rappresenta il compartimento periferico più idoneo per misure proteiche e studi di biomarker. La presenza dell'EDTA nei tubi utilizzati per il prelievo riduce l'attività delle proteasi ed il contenuto proteico del plasma si degrada meno in seguito ad un mantenimento prolungato a -80°C rispetto ai campioni di siero.

L'instabilità dei campioni di siero è una caratteristica nota in letteratura (O'Gorman et al., 1995; O'Mullan et al., 2009), l'attività degli enzimi proteolitici, infatti, persiste anche quando i campioni sono conservati a -80°C , provocando la variabilità dei campioni. L'instabilità del BDNF nel siero conservato a -80°C è stata osservata anche in precedenti studi (Trajkovska et al., 2002) e la presenza di inibitori di proteasi nei tubi di prelievo non ha effetto sulla conservazione del contenuto proteico del siero (Ayache et al., 2007)

I dati discussi in questa tesi dimostrano ulteriormente che i livelli di BDNF nel siero sono altamente instabili e questo spiega la variabilità osservata. L'unica strategia per ridurre l'instabilità dei campioni e la variabilità tra le diverse analisi è rappresentata da un unico reclutamento dei soggetti da analizzare in modo da effettuare il prelievo contemporaneamente, processare immediatamente il sangue ed effettuare le analisi sul siero senza congelare i campioni. Ovviamente questa è una procedura molto complessa da effettuare, il reclutamento contemporaneo dei pazienti non è sempre possibile, soprattutto lavorando con una malattia rara come la malattia di Huntington. Inoltre, anche con questa procedura non si riuscirebbe ad evitare la variabilità dei livelli di BDNF osservata dalle nostre analisi sullo stesso campione di siero analizzato contemporaneamente da due operatori che lavoravano nello stesso bancone con le soluzioni e il kit ELISA in condivisione (figura 9). Quest'ultimo dato discusso è sicuramente il dato più difficile da interpretare, ma in ogni caso tutte le evidenze mostrano chiaramente che i campioni di siero non sono appropriati per effettuare misure di proteine in studi di biomarker.

Analisi della letteratura

Nonostante le problematiche affrontate in questa tesi e confermate da altri gruppi, numerosi studi, presenti in letteratura, mostrano misure di BDNF proteina nel siero e nel plasma in diverse patologie. Inserendo in PubMed come parole chiave "BDNF and human and serum" e "BDNF and human and plasma" sono emersi 351 articoli sul siero e 288 sul plasma. Abbiamo deciso quindi di analizzare gli articoli che misuravano il BDNF nel sangue pubblicati tra il 2003 ed il 2011 su diverse patologie. Abbiamo selezionato 30 lavori per le misure del BDNF nel siero e 20 per il plasma (Tabella Supplementare 1 e 2, Zuccato et al., 2011). Da questo studio 2 sono le principali osservazioni da fare: (i) nessun articolo esaminato descrive in modo dettagliato le procedure di raccolta e processamento dei campioni; (ii) i livelli di BDNF misurati nel siero e nel plasma sono molto differenti tra i diversi studi anche nella popolazione

controllo. Il contenuto di BDNF nel siero varia da 0.143 a 80 ng/ml, nel plasma la variabilità è tra 10 e i 10000 pg/ml. La variabilità osservata tra tutti questi studi può derivare da numerosi fattori, quali diversi criteri di selezione dei campioni, le condizioni di digiuno dei soggetti sottoposti a prelievo, la procedura di prelievo del sangue (dimensione dell'ago e tubi utilizzati per il prelievo), tempo trascorso da prelievo e procedura di processamento del campione, condizioni di conservazione dei campioni e diversi kit ELISA utilizzati per le analisi. Poiché tutte queste informazioni spesso non sono descritte, è complesso individuare una spiegazione per la variabilità osservata anche solo nei soggetti controllo.

Le complessità biologiche sopra discusse e la mancanza di un protocollo sufficientemente accurato per l'analisi del BDNF proteina nel siero e nel plasma limitano l'utilizzo di questa misura come possibile marcatore d'insorgenza e progressione di patologia.

L'inadeguata metodologia compromette l'analisi del BDNF proteina nel sangue come possibile marcatore di patologia, ma questa problematica è stata superata per le misure dei messaggeri nel sangue umano. L'analisi dei livelli di RNA messaggero del BDNF nel sangue umano, rispetto alla proteina, è resa più attendibile dalla disponibilità di un metodo di raccolta del sangue che garantisce la conservazione del campione e la stabilità dell'RNA (*PAX gene RNA Tube*).

La misura del BDNF messaggero nel sangue non è informativo

Numerosi esperimenti hanno dimostrato che i livelli di BDNF messaggero e proteina sono ridotti in corteccia e striato di modelli murini della malattia di Huntington e nel cervello di pazienti affetti dalla patologia (Zuccato & Cattaneo review 2007; Zuccato et al., 2008).

La ridotta disponibilità di BDNF nel cervello di soggetti Huntington è quindi considerata un'importante disfunzione da cui può in parte dipendere il fenotipo neuropatologico tipico della malattia. Nonostante una predominante localizzazione nel sistema nervoso, il BDNF è presente anche in tessuti periferici come cuore, prostata, placenta, testicoli, polmoni, ghiandole surrenali, reni, muscoli, stomaco, fegato, midollo osseo, trachea (Pruunsild et al., 2007) e nel sangue (Radka et al., 1996; Fujimura et al., 2002).

La funzione del BDNF nel sangue non è ancora nota ma è stato osservato che cellule mononucleate secernono la proteina in risposta a stimoli infiammatori (Schenone et al., 1996; Schuhmann et al., 2005), facendo quindi ipotizzare un suo coinvolgimento nella flogosi. Sebbene non sia chiaro se nell'uomo l'espressione e il metabolismo del BDNF siano regolati allo stesso modo nel cervello e in periferia, è stato dimostrato che i cambiamenti dei livelli periferici di BDNF nel ratto sono correlabili a quelli nel cervello durante lo sviluppo (Karege et al., 2002).

In seguito agli studi preclinici condotti nel nostro laboratorio che hanno evidenziato una progressiva riduzione dei livelli di RNA messaggero del BDNF nel sangue di modelli murini di Huntington (topi R6/2 esprimenti l'esone I del gene umano dell'huntingtina mutata al fine di avere 150 CAG e ratti transgenici esprimenti un frammento di huntingtina di 1962 paia di basi dotato di 51 CAG), e che tale decremento è risultato correlabile alla diminuzione riscontrata a livello della corteccia cerebrale (Conforti et al., 2008), abbiamo ipotizzato che il messaggero del BDNF nel sangue umano potesse essere un marcatore biologico per la Malattia di

Huntington. Abbiamo, quindi, pianificato un *hypothesis driven study* che avesse l'obiettivo di quantificare i livelli di RNA messaggero del BDNF nei tessuti periferici di pazienti Huntington e soggetti controllo.

In una prima fase sperimentale abbiamo valutato i livelli di RNA messaggero del BDNF nel sangue di 8 soggetti controllo, 10 volontari sani e 22 pazienti appartenenti al Gruppo Inglese B ed i risultati ottenuti hanno indicato che il contenuto di RNA messaggero del BDNF nei campioni è diverso in base al "*reference gene*" utilizzato per la normalizzazione dei dati. Se i livelli di RNA messaggero del BDNF vengono normalizzati sull'RNA messaggero del GAPDH (figura 11A) si osserva una riduzione statisticamente significativa dell'espressione del BDNF nei malati rispetto ai soggetti sani (*Mann-Whitney U-test* $p < 0,05$). Non si osservano invece differenze significative nel contenuto di BDNF messaggero tra controlli e pre-sintomatici o tra pre-sintomatici e pazienti con malattia conclamata. Quando invece l'RNA messaggero del BDNF viene normalizzato sul contenuto di trascritto della $\beta 2$ -microglobulina, "*reference gene*" più specifico per il sangue e più stabile del GAPDH come descritto in letteratura (Zhang et al., 2005), non si rileva una differenza che consenta di discriminare tra soggetti controllo, pre-sintomatici e pazienti Huntington (figura 11B).

Questi risultati indicano per la prima volta che la strategia di normalizzazione convenzionale basata sull'utilizzo di un singolo gene controllo, può portare, in condizioni di qPCR su cDNA retrotrascritto da RNA estratto da sangue periferico intero, ad errori di quantificazione dell'RNA messaggero d'interesse.

Lo sviluppo di un nuovo sistema di normalizzazione

Sono necessari quindi nuovi sistemi di normalizzazione che consentano di effettuare misure accurate dei trascritti in esame e che riflettano la reale situazione nel paziente senza alterazioni dovute ad errori tecnici di quantificazione basati sulla scelta di "*reference genes*" non stabili. Una strategia più solida per la normalizzazione dei dati è stata proposta da Vandesompele e colleghi che hanno sviluppato un algoritmo, GeNorm, che consente di identificare, su un ampio pannello di "*reference genes*", quelli più stabili entro uno specifico tessuto di interesse (Vandesompele et al., 2002). E' stato, infatti, dimostrato che non esistono "*reference genes*" universali per tutti i tipi di cellule e tessuti e che i livelli d'espressione dei geni controllo variano di tessuto in tessuto in funzione dell'attività svolta dalla proteina per cui codificano. Sebbene l'algoritmo GeNorm sia un robusto metodo di normalizzazione, applicabile anche al sangue, la necessità di ricercare i geni controllo più stabili nel tessuto in analisi, di condurre PCR quantitative Real-time su almeno tre "*reference genes*" oltre che sul gene d'interesse e di avere un numero elevato di replicati lo rendono difficilmente applicabile come metodo di normalizzazione nella ricerca di *biomarkers*. Un saggio per la valutazione di un marcatore biologico dovrebbe, infatti, essere pratico e veloce per permettere di seguire la progressione della patologia o gli effetti di un trattamento farmacologico. Inoltre, in condizioni patologiche caratterizzate da disregolazione della trascrizione genica, come la Malattia di Huntington, la scelta dei geni controllo per l'analisi con GeNorm può risultare molto difficoltosa e laboriosa, perché l'alterazione dell'attività dei fattori di trascrizione o l'alterazione delle sequenze del DNA bersaglio possono inficiare anche i livelli di RNA messaggero dei "*reference*

genes" selezionati, determinando un errore nella quantificazione dell'espressione del gene d'interesse.

In conformità a queste osservazioni, uno degli scopi di questa tesi è stata la messa a punto di un protocollo per l'analisi quantitativa e sistematica dei trascritti derivanti dalle EAR in tessuti umani (sangue e corteccia) (figura 12). Per validare questo nuovo metodo di normalizzazione, abbiamo messo a confronto la quantificazione dei livelli di BDNF nel sangue di soggetti sani ottenuta normalizzando con le sequenze EAR rispetto a GeNorm. Non essendo presenti in letteratura applicazioni dell'algoritmo GeNorm al sangue intero umano, è stato necessario inizialmente selezionare dei geni controllo specifici di questo tessuto e individuare tra essi i 3 più stabili (GNB2L1, HPRT1 e YWHAZ) (figura 13). Il confronto dei livelli di messaggero del BDNF nel sangue di soggetti controllo normalizzati sulle EAR e sull'NF ha evidenziato che: i) il metodo delle sequenze EAR è un buon metodo di normalizzazione, paragonabile al metodo messo a punto da Vandesompele (coefficiente di correlazione di Pearson $< 0,05$) (figura 14A e B), ii) il metodo da noi messo a punto riduce la variabilità osservata nei livelli di RNA messaggero del BDNF dovuta all'utilizzo di "*reference genes*" non sufficientemente stabili, in quanto l'abbondanza delle sequenze EAR nel trascrittoma non può essere influenzata in modo significativo da variazioni fisiologiche o patologiche dei processi trascrizionali. Il metodo di normalizzazione con le sequenze EAR rispetto a GeNorm consente di: i) ridurre il materiale biologico da utilizzare per le analisi del messaggero del BDNF; ii) ridurre i reagenti impiegati per gli esperimenti; iii) ridurre le spese legate alle analisi. Inoltre la validazione del metodo di normalizzazione con le sequenze EAR, per la quantificazione dei messaggeri nel sangue, come la citochina IL8, potrebbe essere di particolare interesse per fare un bilancio tra le citochine pro- e anti- infiammatorie presenti nel sangue di soggetti affetti da patologie autoimmuni o da infiammazioni croniche. Tale quantificazione potrebbe, infatti, essere utilizzata per monitorare lo stato patologico di un paziente e avere quindi una certa rilevanza clinica.

La ricerca di un metodo di normalizzazione rapido, sensibile, che consenta di ridurre il consumo dei campioni biologici in qPCR non è cruciale solamente per la quantificazione del messaggero di geni espressi nel sangue, ma in generale per l'analisi dell'espressione genica nel trascrittoma umano. Per confermare la validità del metodo di normalizzazione con le sequenze EAR anche in altri tessuti umani, si sono valutati i livelli di RNA messaggero del BDNF nella corteccia cerebrale col fine di replicare uno studio già effettuato durante la mia tesi di laurea nel quale erano stati analizzati i livelli di RNA messaggero di BDNF nella corteccia prelevata *post-mortem* da 20 pazienti Huntington e 17 soggetti controllo ricorrendo ad una normalizzazione dei dati col messaggero del GAPDH. Tale analisi aveva portato a evidenziare una riduzione significativa dei livelli di BDNF messaggero nella corteccia di soggetti Huntington rispetto alla corteccia di soggetti controllo (Zuccato et al., 2008). Utilizzando lo stesso RNA usato in questo studio, abbiamo ripetuto l'analisi dei livelli di RNA messaggero del BDNF nella corteccia di 7 soggetti controllo e 6 pazienti Huntington ricorrendo alla normalizzazione sui trascritti EAR e sul messaggero del GAPDH. I risultati ottenuti confermano, anche con la strategia di normalizzazione delle EAR, la riduzione dei livelli di messaggero del BDNF nella corteccia di individui affetti dalla malattia rispetto a soggetti controllo (*Mann-Whitney test* $p < 0,05$) (figura 15). Questi dati dimostrano la validità del metodo di normalizzazione basato

sull'amplificazione delle sequenze EAR per la quantificazione di geni d'interesse anche in altri tessuti umani diversi dal sangue; l'ampia distribuzione delle sequenze EAR nel genoma umano e l'assenza di espressione tessuto-specifica ne consentono l'utilizzo in campioni biologici di origine diversa.

Una volta sviluppato un metodo di normalizzazione affidabile per la normalizzazione di RNA messaggeri nei tessuti umani, basandoci sui molteplici dati presenti in letteratura che confermano come la ridotta produzione di BDNF possa contribuire al fenotipo neuropatologico dell'Huntington, abbiamo deciso di analizzare i livelli di questa neurotrofina nel sangue del paziente, per capire se possa rappresentare un marcatore biologico della patologia.

In questo studio sono stati valutati i livelli di BDNF nel sangue di 48 soggetti controllo, 25 pre-sintomatici e 74 pazienti con malattia conclamata. Al contrario dei dati ottenuti negli studi pre-clinici su modelli animali Huntington (Conforti et al., 2008), le nostre analisi evidenziano elevata variabilità nei livelli di RNA messaggero sia nella popolazione controllo che nei pazienti affetti dalla Malattia di Huntington ed escludono l'esistenza di una differenza significativa dei livelli di RNA messaggero del BDNF nel sangue di pazienti Huntington rispetto a soggetti controllo in entrambi i gruppi di campioni analizzati (figura 16). Questa mancanza di correlazione potrebbe essere attribuita al fatto che, come hanno evidenziato studi in letteratura, il BDNF è sensibile a numerosi stimoli. Studi preclinici effettuati su modelli animali Huntington hanno ad esempio rivelato che un regime dietetico restrittivo e una maggior attività fisica incrementano i livelli di BDNF e migliorano i deficit cognitivi, mentre lo stress determina una riduzione dei livelli di BDNF messaggero (Mattson et al., 2002). Anche nell'uomo si sono riscontrati incrementi dei livelli di proteina e messaggero del BDNF a seguito di attività fisica e un decremento della neurotrofina e del suo RNA messaggero in condizioni di stress e a seguito dell'esposizione a nicotina (Li et al., 2005; Pedersen et al., 2009; Mitoma et al., 2008; Andresen et al., 2009). Uno studio condotto da Lommatzsch su volontari sani ha ad esempio evidenziato una correlazione negativa tra i livelli periferici del BDNF proteina e peso ed età (Lommatzsch et al., 2005) che può spiegare la variabilità osservata nella popolazione controllo. In letteratura è riportato anche che in individui affetti da disturbi dell'umore c'è una riduzione dei livelli ematici di BDNF e che trattamenti con farmaci antidepressivi sono in grado di riportare tali livelli ai valori riscontrati in soggetti controllo (Karege et al., 2002; 2005; Schimizu et al., 2003; Gonul et al., 2005; Piccinni et al., 2007; Grassi-Oliveira et al., 2008). La maggior parte dei pazienti affetti dalla Malattia di Huntington è in terapia con farmaci appartenenti a questa classe e ciò può aver influito sui livelli di RNA messaggero del BDNF misurati nel nostro studio. Da un'analisi preliminare dei dati clinici si riscontra però l'assenza di correlazione tra livelli di RNA messaggero del BDNF e somministrazione di farmaci che stimolano la produzione di neurotrofina. E' infine possibile che nell'uomo i meccanismi che regolano la trascrizione del gene del BDNF e la stabilità dei suoi trascritti non siano i medesimi a livello centrale ed in periferia. Ciò potrebbe contribuire a complicare il quadro delle analisi. I risultati ottenuti in questa tesi e l'azione di molteplici fattori difficilmente controllabili nell'uomo che influenzano la trascrizione del BDNF, allontanano a nostro parere la possibilità di utilizzare questa neurotrofina come potenziale *biomarker* della Malattia di Huntington.

Come fase conclusiva di questo progetto ci siamo chiesti se era possibile replicare i dati pubblicati su RNA messaggeri biomarker precedentemente identificati nei pazienti HD con il nuovo metodo di normalizzazione da noi sviluppato.

In un articolo pubblicato nel 2005 su PNAS dal gruppo di Dimitri Krainc del *Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School*, venivano presentati come potenziali marcatori biologici di patologia 12 geni, l'espressione di 8 dei quali veniva dichiarata influenzata a livello periferico dalla somministrazione di fenilbutirrato, una sostanza dimostratasi neuroprotettiva in topi Huntington (Gardian et al., 2005). Sulla base di questi risultati abbiamo deciso di analizzare i livelli di RNA messaggero di due di questi geni (ANXA1 E ROCK1) nel sangue di soggetti controllo e di pazienti Huntington inclusi nel nostro studio. Abbiamo ripetuto le analisi di PCR quantitativa Real-time come riportato dal gruppo di Dimitri Krainc, utilizzando come unico gene controllo la β -actina, risultata però nell'analisi da noi condotta con GeNorm, non stabile nel sangue. Parallelamente abbiamo analizzato i livelli di RNA messaggero di questi geni normalizzandoli anche sul contenuto delle EAR.

Queste analisi hanno mostrato che la procedura di normalizzazione basata sulle EAR consente di ridurre la variabilità osservata nei campioni dovuta alla scelta di un gene controllo, la β -actina, non sufficientemente stabile. Inoltre, le nostre analisi hanno evidenziato la non replicabilità del dato presentato nel 2005 da Borovecki, anche nelle condizioni sperimentali da lui stabilite (figura 17). Lo stesso risultato, ossia la non replicabilità del dato del gruppo di Krainc, è stata riscontrata anche dalla Dott.ssa Luthi-Carter del *Laboratory of Functional Neurogenomics, Brain Mind Institute, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne* (Runne et al., 2007). Queste ultime osservazioni suggeriscono che l'analisi del trascrittoma può essere altamente variabile e quindi difficilmente utilizzabile per tracciare i cambiamenti molecolari in campioni biologici prelevati da pazienti Huntington. E' quindi necessaria l'identificazione di una nuova strategia, alternativa alla quantificazione dei livelli di RNA messaggeri specifici, che consenta di seguire le disfunzioni trascrizionali che si verificano in presenza di huntingtina mutata.

CONCLUSIONI

Questo studio, svolto nei primi due anni di dottorato, su 398 campioni analizzati (138 controlli, 56 preHD e 205 pazienti HD) rappresenta una finestra importante nella misura del BDNF messaggero e della proteina in tessuti periferici come il sangue.

Dai dati mostrati è possibile concludere che:

- L'individuazione di un metodo di normalizzazione rapido ed efficace è un punto chiave in studi di espressione genica. A tale fine è stato individuato un'affidabile e riproducibile metodo di normalizzazione basato sulle ripetizioni EAR.
- Utilizzando un'idonea normalizzazione è possibile misurare in modo consistente il messaggero del BDNF nel sangue. I livelli di BDNF mRNA non variano nel sangue dei pazienti HD rispetto ai controlli indicando quindi che la misura del BDNF messaggero nel sangue dei pazienti HD non è informativa sull'insorgenza o sulla progressione della patologia.
- La misura della proteina del BDNF nel plasma e nel siero è influenzata da numerosi fattori biologici e tecnici che rendono queste analisi difficoltose e poco riproducibili. Queste problematiche compromettono la misura del BDNF come marker di patologia non solo per la Malattia di Huntington ma anche per numerose altre patologie quali la depressione, l'obesità, la schizofrenia, l'Alzheimer ed altre.

Se le analisi proteiche e di espressione genica non hanno portato all'individuazione di possibile biomarker per la Malattia di Huntington, una strategia alternativa potrebbe essere l'analisi dello stato della cromatina mediante immunoprecipitazione (ChIP), una tecnica che consente di identificare la regione del genoma a cui si lega un determinato fattore di trascrizione. Essendo la cromatina più stabile rispetto all'RNA, la ChIP potrebbe essere una tecnica riproducibile, oltre che sensibile e specifica. Come ampiamente descritto nell'introduzione, l'huntingtina mutata è in grado di interagire con diversi fattori trascrizionali alterando i processi di trascrizione genica in soggetti affetti dalla Malattia di Huntington. Uno studio preliminare che ho condotto prima del conseguimento del dottorato, ha evidenziato come la ChIP in linfociti per il fattore di trascrizione REST, la cui attività è alterata in modelli animali Huntington, possa essere un valido indicatore periferico delle disfunzioni trascrizionali che si verificano nei pazienti Huntington (Marullo et al., 2008). Questo lavoro ha infatti mostrato, seppur in un numero limitato di campioni (31 pazienti Huntington, 5 pre-sintomatici e 17 controlli), un incremento dell'occupazione della sequenza target di REST (RE1/NRSE) sul genoma di pazienti Huntington rispetto a soggetti controllo.

Rimane quindi aperta la possibilità di utilizzare la ChIP per fattori di trascrizione per la ricerca di marcatori biologici della Malattia di Huntington.

Parte II: Disfunzione del colesterolo nella Malattia di Huntington: ruolo degli astrociti

Dati recenti suggeriscono che l'htt mutata può esercitare il suo effetto tossico anche tramite meccanismi cellulari non autonomi (Zuccato, Valenza, Cattaneo 2010). A tal riguardo, sebbene nella malattia di Huntington la degenerazione colpisca essenzialmente i neuroni, il fatto che gli astrociti esprimano loro stessi l'htt mutata e topi sovra-espressanti l'N-terminale dell'htt mutata solo negli astrociti mostrino perdita di peso, deficit nelle funzioni motorie e muoiono precocemente rispetto ai controlli (Bradford et al., 2009), evidenzia un possibile coinvolgimento da parte degli astrociti alla disfunzione ed alla degenerazione neuronale osservata nell'HD.

La disfunzione della biosintesi del colesterolo come meccanismo patologico alla base della Malattia di Huntington è stata ampiamente studiata nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato. Un recente lavoro ha mostrato che i livelli di RNA messaggero dei geni chiave coinvolti nella biosintesi del colesterolo sono ridotti anche negli astrociti primari derivati da due diversi modelli animali di Huntington (Valenza et al., 2010). La diminuita sintesi di colesterolo comporta una riduzione della produzione e secrezione di ApoE, la Apo-lipoproteina maggiormente presente a livello cerebrale e coinvolta nel trasporto del colesterolo dagli astrociti ai neuroni, che rappresentano gli utilizzatori finali degli steroli. A conferma di ciò, è stato anche dimostrato che ApoE nel liquido cerebro-spinale è associata a lipoproteine di minor dimensione nei topi HD rispetto ai controlli, indicando una riduzione nel trasporto di colesterolo a carico delle lipoproteine-ApoE circolanti nel cervello (Valenza et al., 2010). Inoltre i sinaptosomi, la componente dedicata alla trasmissione degli impulsi nervosi ed al rilascio dei neurotrasportatori, hanno livelli ridotti di steroli in un modello murino HD già a stadi sintomatici (Valenza et al., 2010).

Questi dati mostrano come un difetto nella biosintesi del colesterolo nelle cellule gliali esprimanti l'htt mutata potrebbe compromettere la formazione ed il mantenimento della sinapsi, la crescita neuritica ed altre funzioni neuronali colesterolo-dipendenti, contribuendo alla disfunzione neuronale osservata nella Malattia di Huntington. Inoltre una riduzione, piuttosto che la perdita totale, della biosintesi del colesterolo nelle cellule gliali HD potrebbe portare ad un rallentamento nella formazione di mielina di specifiche strutture cerebrali durante le prime decadi di vita determinando sottili disfunzioni che possono colpire l'integrità mielinica con gravi conseguenze sull'attività neuronale solo durante gli stadi conclamati della malattia. Questa ipotesi è supportata da recenti studi che mostrano come in un modello animale e nei pazienti Huntington vi possano esserci anomalie sottili durante lo sviluppo e la maturazione del sistema nervoso centrale (Molero et al., 2009; Nopoulos et al., 2010) oltre a una neurodegenerazione che si manifesta in età adulta.

Tuttavia non è ancora chiaro se e come nella Malattia di Huntington la disfunzione della biosintesi del colesterolo a carico delle cellule gliali possa contribuire all'alterazione del cross-talk tra astrociti e neuroni con conseguente riduzione di apporto di colesterolo ai neuroni compromettendo l'attività neuronale colesterolo-dipendenti durante i diversi stadi della malattia.

SCOPO

Precedenti evidenze sperimentali, ottenute nel laboratorio dove ho svolto il mio dottorato dalla dott.ssa Valenza, dimostrano una ridotta biosintesi di colesterolo in cellule e nel cervello di diversi modelli animali esprimenti l'huntingtina mutata con conseguente diminuzione del contenuto totale di steroli/colesterolo cerebrale (Valenza et al., 2005; Valenza et al., 2007; Valenza et al., 2007; Valenza et al., 2010). Inoltre, l'ipotesi che tale disfunzione sia presente e rilevante negli individui aventi la mutazione è consolidata dal fatto che i livelli di 24-idrossi-colesterolo, un catabolita del colesterolo di origine cerebrale, risultano ridotti nel cervello di modelli animali HD e nel plasma di pazienti HD (Leoni et al., Brain 2008).

La consistenza e la riproducibilità di questi dati in modelli cellulari e molti modelli animali di HD presi in esame e la conoscenza acquisita che i) il colesterolo cerebrale, prodotto esclusivamente dalla sintesi locale, è un componente essenziale delle membrane neuronali e delle guaine mieliniche ed è cruciale per l'integrità sinaptica e per numerose attività neuronali (Valenza and Cattaneo, 2006); ii) alcune di queste attività dipendono dal colesterolo prodotto e trasportato dagli astrociti ai neuroni a carico delle lipoproteine contenenti ApoE, il trasportatore lipidico principale circolante nel cervello; iii) gli astrociti primari di modelli animali HD mostrano riduzione della biosintesi di colesterolo e una ridotta produzione e secrezione di ApoE (Valenza et al., 2010) supportano l'ipotesi che una disfunzione del colesterolo nell'HD possa contribuire alla patogenesi e/o progressione della malattia.

Lo scopo di questo progetto è

- (1) Valutare una disfunzione della sintesi/secrezione di colesterolo dagli astrociti esprimenti l'htt mutata;
- (2) valutare se la ridotta produzione di colesterolo a carico degli astrociti HD possa influenzare, mediante un meccanismo cellulare non autonomo, le proprietà colesterolo-dipendenti, come la sinaptogenesi e la crescita neuritica, in neuroni sani e in neuroni esprimenti l'huntingtina mutata;
- (3) studiare il meccanismo molecolare alla base di tale disfunzione negli astrociti HD e individuare nuovi possibili bersagli di intervento dal punto di vista terapeutico.

In conclusione questo progetto ha lo scopo di esplorare in modo approfondito il legame fra il colesterolo e la malattia di Huntington, ponendo una maggior attenzione alle componenti cellulari coinvolte ed al meccanismo molecolare responsabile dell'alterazione del *cross-talk* astrociti-neuroni.

RISULTATI**CONTRIBUTO DEGLI ASTROCITI ESPRIMENTI L'HUNTINGTINA MUTATA ALLA RIDOTTA BIOSINTESI DI COLESTEROLO NELL'HD.****Valutazione della ridotta biosintesi e secrezione del colesterolo negli Astrociti primari derivati dal topo R6/2.**

Molte evidenze sperimentali indicano che l'effetto tossico dell'htt mutata possa esplicarsi anche mediante meccanismi cellulari non autonomi. Un difetto nella biosintesi del colesterolo nelle cellule gliali esprimenti l'htt mutata potrebbe compromettere la formazione ed il mantenimento della sinapsi, la crescita neuritica ed altre funzioni neuronali contribuendo alla degenerazione neuronale osservata nella Malattia di Huntington. I dati precedentemente ottenuti, mostrano come astrociti primari derivati da due diversi modelli animali di Huntington il topo transgenico R6/2, (Mangiarini et al., 1996) sovra-esprime l'esone 1 dell'huntingtina umana mutata con 150 ripetizioni della tripletta CAG sotto il controllo del promotore endogeno umano dell'huntingtina, ed un altro modello transgenico basato sull'Yeast Artificial Chromosome (YAC) sovra-esprime l'huntingtina intera umana con 46, 72 o 128 glutamine (Hodgson et al., 1999; Slow et al., 2003), esprimono ridotti livelli di geni chiave della sintesi di colesterolo (*Hmgcr* codificante per l'enzima limitante della via, *Cyp51*, un gene intermedio, e *7dhcr*, l'ultimo gene della via) (Valenza et al., 2010). Nello stesso lavoro è stato dimostrato come nei topi YAC la riduzione della sintesi di colesterolo negli astrociti HD influenza l'espressione dei geni responsabili dell'efflusso del colesterolo, come ABCA1 ed ApoE, con conseguente diminuzione dei livelli di ApoE proteina cellulari e presenti nel medium (Valenza et al., 2010). Questi risultati indicano che gli astrociti derivati dai topi YAC non solo sintetizzano meno colesterolo ma producono e rilasciano anche ridotti livelli di APOE.

I dati sopra descritti ci hanno spinto ad approfondire il cross-talk tra astrociti ed neuroni in presenza dell'huntingtina mutata. Abbiamo quindi inizialmente valutato tramite Western Blot (WB) i livelli di ApoE proteina negli astrociti derivati dal topo transgenico R6/2 e relativi WT. Dopo una derivazione in vitro di 18 giorni, gli astrociti sono stati incubati per 8 ore in DMEM-F12, un medium privo di siero per promuovere l'attivazione della sintesi di colesterolo e l'incremento dell'efflusso di ApoE-colesterolo (figura 18A). L'incubazione per 8 ore con il DMEM F12 in assenza di siero promuove la sintesi ed il rilascio di colesterolo. Come atteso, l'analisi dei livelli di ApoE proteina negli astrociti derivati dai topi R6/2 sono ridotti rispetto ai livelli di ApoE negli astrociti WT (figura 18B) confermando il risultato ottenuto sui topi transgenici YAC. Inoltre, sono stati analizzati i livelli di ApoE nel DMEM-F12 raccolto dopo l'incubazione di 8 ore con gli astrociti. Tale medium contiene il colesterolo esclusivamente prodotto dagli astrociti e

rilasciato tramite ApoE e prende il nome di *Glia Conditioned Medium (GCM)*, il medium condizionato dagli astrociti che verrà poi utilizzato per le analisi successive. La figura 18C mostra una riduzione dei livelli di ApoE nel medium raccolto dagli astrociti R6/2 rispetto i livelli di ApoE presenti nel medium condizionato dagli astrociti WT come precedentemente osservato nel medium condizionato degli astrociti derivati da topi YAC.

L'insieme dei dati sopra discussi e di quelli pubblicati in precedenza (Valenza et al., 2010) che evidenziano una riduzione nella sintesi/secrezione di colesterolo da parte degli astrociti esprimenti htt mutata, rafforzano l'ipotesi di un'alterazione dell'apporto di colesterolo ai neuroni, mediante un meccanismo cellulare non autonomo, con conseguente perdita da parte di quest'ultimi di attivata' neuronali colesterolo dipendenti nella Malattia di Huntington.

Valutazione della ridotta biosintesi e secrezione del colesterolo negli astrociti derivati da cellule staminali neurali (NS)

In parallelo alle analisi svolte su astrociti primari, abbiamo valutato la presenza dell'alterazione della sintesi e secrezione del colesterolo anche in astrociti derivati da cellule neurali staminali (NS) WT ed esprimenti l'htt con un'espansione crescente del tratto CAG. Nello specifico, abbiamo a disposizione cellule NS eterozigoti knock-in esprimenti htt con 48, e 140Q (chiamate in generale NS_{HD}). Queste cellule sono state recentemente derivate e caratterizzate nel nostro laboratorio. Le cellule NS_{WT} e NS_{HD} in proliferazione mostrano tutte le caratteristiche dei precursori neurali ed esprimono Sox2 e Nestin (marcatori di staminali neurali) mentre, se sottoposte a specifico protocollo di differenziamento, differenziano in astrociti o in neuroni (Conti et al., 2005; Spiliotopoulos et al., 2009). Per valutare i livelli di sintesi e secrezione di colesterolo dagli astrociti-NS derived, le cellule NS_{WT} e le NS_{HD} sono state incubate in un medium in presenza di siero (10%) che promuove il differenziamento astrocitario, e dopo 14 giorni di differenziamento (figura 19A) è stata effettuato un'immunocitochimica (ICC) per controllare la presenza di marcatori astrocitari quali GFAP e S100beta (figura 19B). Al 14° giorno di differenziamento, analisi di WB hanno mostrato ridotti livelli di ApoE medium condizionato dagli astrociti derivati dalle NS^{Hdh48Q} e NS^{Hdh140Q} (figura 19C).

Questi dati indicano che gli astrociti derivati da cellule staminali neurali esprimenti huntingtina mutata sono in grado di ricapitolare aspetti della malattia relativi alla disfunzione del metabolismo del colesterolo osservati precedentemente nelle colture primarie di astrociti di topi HD.

INFLUENZA DI MECCANISMI CELLULARI NON AUTONOMI SULLE PROPRIETÀ NEURONALI COLESTEROLO-DIPENDENTI.

Crescita neuritica in neuroni derivati da NS

Per valutare se la crescita neuritica, proprietà neuronali colesterolo dipendente, fosse compromessa in seguito ad un minor apporto di colesterolo da parte degli astrociti mutati,

abbiamo come prima cosa individuato un adeguato modello di cellule neuronali per analizzare i parametri di attività neuronale sopra citati. Considerando la familiarità nell'utilizzo delle cellule NS_{WT} e NS_{HD} e la loro capacità di differenziare in tempi brevi a neuroni con progressiva comparsa di marcatori neuronali come beta-3-tubulina (neuroni immaturi) e proteina 2-associata ai microtubuli, MAP2 (neuroni post-mitotici), abbiamo condotto un esperimento preliminare per assicurarci che i neuroni NS-derived potessero rappresentare un buon modello per valutare se un difetto nella biosintesi del colesterolo nelle cellule gliali esprimenti l'htt mutata possa compromettere la formazione e la crescita neuritica.

Le cellule NS_{WT} e NS_{HD} sono state mantenute in condizioni di differenziamento neuronale per 7 giorni (figura 20A) prima di essere analizzate, tramite ICC e FACS, per l'espressione del marcatore MAP2, indice di crescita neuritica. L'analisi al FACS (figura 20B) mostra come entrambe le linee di neuroni-NS_{HD} presentano una ridotta marcatura per il marcatore neuronale MAP2 rispetto ai neuroni-NS_{WT}. I risultati, dimostrando che il 31% dei neuroni-NS_{WT} ma solo 19% di neuroni-NS^{Hdh48Q} e 20% di neuroni-NS^{Hdh140Q} co-localizzano effettivamente con MAP2. Inoltre, osservando le immunocitochimiche effettuate per MAP2, si è notato che i neuroni-NS_{HD} presentano una minor crescita neuritica al giorno 7 del differenziamento (figura 20C). Si è quindi cercato un metodo per quantificare non il numero di cellule MAP2 positive l'elongazione neuritica di questi neuroni. Il plugin di ImageJ "NeuriteTracer" è stato usato per quantificare la crescita neuritica tra i neuroni ottenuti dalle diverse linee di NS. La quantizzazione della crescita neuritica, effettuata mediante Neurite Tracer, ha confermato questa osservazione, mostrando come la crescita neuritica nei neuroni-NS_{HD} risulta significativamente ridotta rispetto ai neuroni NS_{WT} (figura 20D).

I risultati ottenuti indicano che i neuroni NS-derived possono essere un buon modello per studiare l'influenza del colesterolo di origine gliale sulla crescita neuritica.

Influenza del colesterolo sulla crescita neuritica

Per capire se la crescita neuritica sia effettivamente influenzata dal colesterolo, sono state somministrate dosi crescenti di colesterolo alle cellule NS_{WT} e NS_{HD} durante il differenziamento neuronale. Il colesterolo è stato aggiunto al medium di differenziamento al giorno 4 dell'induzione neurale (figura 21A). Al 7° giorno di differenziamento le cellule sono state fissate in PFA al 4% ed è stata condotta un'immunocitochimica per il marcatore neuronale MAP2. La lunghezza dei processi neuritici, evidenziata dal marcatore MAP2, è stata successivamente quantizzata tramite il plugin di ImageJ. Come mostrato in figura 21B, il colesterolo (5µg/ml) promuove la crescita neuritica sia nei neuroni NS_{WT} che nei neuroni NS_{HD}. La quantificazione della crescita neuritica tramite Neurite Tracer mostra un aumento significativo dell'elongazione neuritica nei neuroni NS-derived trattati con colesterolo rispetto ai neuroni derivati dalle stesse cellule trattate con il veicolo (figura 21C). Questo risultato conferma che il colesterolo è uno dei fattori chiave coinvolto nella crescita neuritica.

Influenza del colesterolo proveniente dagli astrociti sulla crescita neuritica

Una volta dimostrato che la somministrazione di colesterolo ai neuroni NS_{HD} implementa la crescita neuritica, ci siamo chiesti se era possibile ottenere un'incremento dell'elongazione neuritica nei neuroni NS_{HD} con il medium condizionato precedentemente da astrociti primari wt (GCM_{WT}) ed di non osservare nessuna variazione implementando il medium di differenziamento con il medium condizionato da astrociti primari di topi HD-R6/2 (GCM_{R6/2}). Infatti, se la secrezione di ApoE (che trasporta colesterolo) da parte degli astrociti influenza le proprietà neuronali, la crescita neuritica sarà favorita in seguito al trattamento con GCM_{WT} nei neuroni NS_{HD}. Contrariamente, l'esposizione a GCM_{R6/2} risulterà meno efficace a causa del ridotto rilascio di ApoE-colesterolo da parte degli astrociti esprimenti l'huntingtina mutata.

Al giorno 4° del differenziamento, il medium di differenziamento dei precursori neurali derivati dalle NS^{WT}, NS^{Hdh48Q} e NS^{Hdh140Q} è stato implementato con il GCM_{WT} e il GCM_{R6/2} (figura 22A). Le cellule sono state fissate in PFA al 4% al giorno 7 del differenziamento ed è stata condotta un'analisi di ICC per il marcatore MAP2. Come osservato con il colesterolo, l'aggiunta di GCM_{WT} è in grado di promuovere in modo significativo la crescita neuritica nei neuroni NS_{HD}. Viceversa, l'aggiunta di GCM_{R6/2} non è in grado di promuovere con la stessa efficienza tale processo (figura 22B-C).

Questi esperimenti rafforzano l'ipotesi che un apporto di colesterolo da parte del GCM_{WT} possa contribuire ad un recupero della crescita neuritica nei neuroni NS_{HD} e che la ridotta secrezione di ApoE-colesterolo da parte degli astrociti HD possa invece compromettere tale attività neuronale.

"De-lipoproteinizzazione" del GCM_{WT} ed effetto sulla crescita neuritica

Il GCM prodotto dagli astrociti contiene numerosi fattori che potrebbero influenzare il processo di elongazione neuritica. La somministrazione di colesterolo ai neuroni NS_{HD} con il conseguente incremento della crescita neuritica è sicuramente una prima forte evidenza del coinvolgimento di questa molecola per l'attività neuronale colesterolo dipendente presa in esame. Per rafforzare ulteriormente questa evidenza abbiamo deciso di rimuovere dal GCM_{WT} le lipoproteine, tra cui ApoE-colesterolo (GCM_{WT-delip}), e di somministrare il GCM_{WT-delip} ai neuroni derivati da NS_{HD}. Se l'incremento di crescita neuritica osservato negli esperimenti precedenti in seguito al trattamento dei neuroni NS_{HD} con il GCM_{WT} è legato alla presenza di ApoE-colesterolo nel medium, non dovremmo osservare nessun recupero dell'elongazione neuritica nei neuroni derivati dalle NS_{HD} differenziati con il medium implementato con GCM_{WT-delip}. Il GCM raccolto dopo 8 ore di incubazione con gli astrociti WT è stato incubato per 30 minuti con Carbo-O-sil (SIGMA), una resina in grado di legare le lipoproteine ed eliminarle dal medium. In seguito ad una breve centrifuga di 5 minuti a 1000rpm la resina è stata rimossa ed il medium GCM_{WT-delip} è stato implementato al terreno di differenziamento neuronale. Un'aliquota del GCM_{WT-delip} è stata analizzata tramite WB per verificare la riduzione dei livelli di ApoE. La WB per ApoE non mostra alcuna traccia della proteina nel medium in confronto ai livelli della stessa lipoproteina presente nel GCM_{WT} e GCM_{HD} (figura 23A). Al 7° giorno di

differenziamento, i neuroni trattati con $GCM_{WT-delip}$ sono state fissate in PFA al 4% ed in seguito all'ICC per il marcatore MAP2, è stata valutata la crescita neuritica tramite il plugin Neurite Tracer. Come atteso, i neuroni derivati dalle NS^{Hdh48Q} e $NS^{Hdh140Q}$ differenziati in presenza del $GCM_{WT-delip}$ non mostrano alcun incremento della crescita neuritica rispetto agli stessi neuroni trattati con GCM_{WT} . I neuroni NS^{Hdh48Q} e $NS^{Hdh140Q}$ trattati con il $GCM_{WT-delip}$ mostrano un livello di crescita neuritica sovrapponibile ai neuroni differenziati in presenza di $GCM_{R6/2}$ (figura 23B-C).

I risultati sopra discussi confermano la nostra ipotesi che il colesterolo rilasciato dagli astrociti WT nel medium ha effetto positivo nel promuovere la crescita neuritica nei neuroni HD.

Effetto dell'ApoE-colesterolo sulla maturazione sinaptica

I livelli di colesterolo influiscono sulla formazione delle vescicole sinaptiche e sul loro legame alla membrane plasmatica. Per questo motivo la seconda disfunzione neuronale colesterolo dipendente presa in esame in questa tesi è la formazione ed il mantenimento della sinapsi. Il processo di sinaptogenesi richiede un livello di maturazione elevata dei neuroni. Il differenziamento neuronale delle cellule NS permette di ottenere in vitro neuroni post-mitotici, ma non sempre garantisce la formazione di strutture sinaptiche e l'espressione delle proteine coinvolte nella trasmissione del segnale a livello pre/post sinaptico. Basandoci su queste osservazioni, abbiamo deciso di valutare l'effetto del colesterolo gliale sull'attività sinaptica in neuroni primari generati da topi WT. I neuroni primari sono stati isolati dalla corteccia di topi allo stadio embrionale di 18.5 giorni (E18.5), disgregati delicatamente con papaina e messi in coltura su un coating di poli-Dilisina. I neuroni corticali primari sono stati mantenuti fino al 4° giorno di derivazione in vitro (DIV) in DMEM F12 implementato con il B27 e dal giorno 5DIV il medium è stato implementato con il DMEM F12 condizionato dagli astrociti WT (GCM_{WT}) e R6/2 ($GCM_{R6/2}$) in proporzione 1:1. I neuroni corticali sono stati mantenuti in vitro fino al 10DIV prima di essere processati per le analisi. La formazione e il mantenimento delle sinapsi, in condizione normale di crescita ed in seguito al trattamento con i 2 GCM, sono stati analizzati mediante analisi di immunocitochimica con anticorpi per sinapsina1 e sinaptogamina, marcatori di terminali sinaptici, mentre analisi di WB sono state effettuate su un pannello di marcatori sinaptici più ampi quali sinaptofisina, sinaptogamina e PSD95. Da questi esperimenti è emerso un incremento delle proteine sinaptiche in neuroni primari WT in seguito al trattamento con il GCM_{WT} . Le analisi di ICC mostrano un segnale più intenso della sinaptogamina nei neuroni trattati con il GCM_{WT} rispetto ai neuroni trattati con il $GCM_{R6/2}$ o non trattati (figura 24A). La quantificazione della sinaptogamina e delle altre proteine sinaptiche analizzate per WB (sinaptofisina, sinapsina e PSD95) confermano un aumento significativo dei livelli di Sinaptogamina e dei marcatori post-sinaptico PSD95 nei neuroni corticali trattati con il GCM_{WT} (figura 24B). L'aggiunta di GCM_{WT} , ma non di $GCM_{R6/2}$, promuove quindi l'espressione di alcune proteine sinaptiche, a conferma dell'ipotesi del ruolo del colesterolo gliale nella formazione e maturazione delle sinapsi. Inoltre ci siamo chiesti se l'incremento dell'espressione delle proteine sinaptiche osservato tramite WB fosse correlato ad un incremento della maturazione elettrofisiologica dei neuroni corticali. Per rispondere a questa

domanda, abbiamo deciso di condurre delle analisi di elettrofisiologia sui neuroni primari corticali trattati con GCM_{WT} e GCM_{R6/2}. Analisi preliminari di patch clamp su neuroni corticali primari al 10DIV derivati in presenza di GCM_{WT} (4 cellule misurate) e GCM_{R6/2} (3 cellule misurate) mostrano un diverso profilo di potenziali d'azione tra i trattamenti. Come è possibile osservare dalla figura 25, i neuroni corticali trattati con il GCM_{WT} (pannello A) rispondono all'applicazione di un gradino di corrente depolarizzante sopra soglia con un pattern di scarica ripetitiva di potenziali d'azione indice di una maggior maturazione neuronale, contrariamente le misurazioni effettuate sui neuroni corticali derivati in presenza di GCM_{R6/2} rispondono all'applicazione di un medesimo protocollo di stimolo generando solo un singolo potenziali d'azione abortivo (pannello B). I dati sopra descritti rafforzano l'ipotesi che la ridotta secrezione di ApoE da parte degli astrociti HD con conseguente riduzione dei livelli di colesterolo nel GCM_{R6/2} influisce sulla maturazione sinaptica. Ulteriori analisi di elettrofisiologie sono necessarie per approfondire il coinvolgimento del colesterolo sull'attività sinaptica. Inoltre, lo stesso studio è in corso su neuroni primari da topi R6/2.

MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELLA DISFUNZIONE DEL COLESTEROLO NEGLI ASTROCITI HD

Modulazione dell'attività di SREBP negli astrociti ed effetto sulla crescita neuronale

La maggior parte dei geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo sono regolati dal punto di vista trascrizionale da SREBP tramite la sequenza Sterol Regulatory Element (SRE) localizzata nel promotore dei geni bersaglio. Precedenti studi hanno mostrato che l'attività SRE ed i livelli nucleari della forma attiva di SREBP sono ridotti in una linea cellulare di derivazione striatale sovra-esprimente l'htt mutata e nel cervello di un modello murino HD con conseguente riduzione della trascrizione dei geni coinvolti nella sintesi del colesterolo (Valenza et al., 2005). Inoltre, i livelli di RNA messaggero dei geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo risultano diminuiti anche in astrociti primari HD (Valenza et al., 2010), suggerendo che l'attività di SREBP potrebbe essere ridotta anche nelle cellule gliali esprimenti l'htt mutata.

Ci siamo chiesti quindi se il meccanismo di SREBP2 sia effettivamente compromesso negli astrociti HD e se tale meccanismo contribuisca effettivamente alla minor produzione/secrezione di colesterolo dagli astrociti ai neuroni influenzando la sinaptogenesi e la crescita neuritica.

Per rispondere a questa domanda biologica abbiamo messo a punto esperimenti di acquisto e di perdita di funzione per modulare l'espressione di SREBP2 negli astrociti sani e HD al fine di valutare se il meccanismo di SREBP2 sia effettivamente compromesso negli astrociti HD e se tale meccanismo contribuisca effettivamente alla minor produzione/secrezione di colesterolo dagli astrociti ai neuroni influenzando la sinaptogenesi e la crescita neuritica.

Abbattimento dell'espressione di SREBP2 in astrociti primari WT

Per valutare se una ridotta attività di SREBP nelle cellule gliali possa compromettere la secrezione di ApoE-colesterolo e influenzare le proprietà neuronali, abbiamo condotto analisi di silenziamento genico tramite un RNA interferente (siRNA) specifico per SREBP2 (BP2_i) in astrociti primari derivati da topi WT. Se i livelli di BP2 influenzano l'efflusso di ApoE-colesterolo, gli astrociti WT trattati con BP2_i dovrebbero rilasciare meno ApoE nel medium e quindi i neuroni NS_{HD} trattati con il GCM generato dagli astrociti WT nucleofettati con BP2_i (GCM_{BP2i}) non dovrebbero mostrare alcun recupero dei livelli di MAP2 rispetto agli stessi neuroni non trattati. Mentre, i neuroni NS_{HD} differenziati in presenza del GCM generato dagli astrociti WT nucleofettati con il RNA interferente (GCM_{SCRAM}), che funge da controllo, dovrebbero mostrare un incremento della crescita neuritica paragonabile a quella osservata trattando i neuroni NS_{HD} con il normale GCM_{WT}.

L'attuazione di questo paradigma sperimentale ha compreso la derivazione in vitro di astrociti primari da topi WT fino al giorno 18. Il giorno seguente gli astrociti sono stati nucleofettati con il BP2_i e con SCRAM_i, e dopo 48 ore dalla nucleofezione gli astrociti sono stati tenuti in coltura con DMEM F12 per 8 ore (figura 26A). L'abbattimento dell'espressione di BP2 negli astrociti primari WT nucleofettati è stata analizzata tramite analisi di qPCR (figura 26B) ed analisi di WB sul GCM_{BP2i} ed il GCM_{SCRAM} sono state effettuate per valutare i livelli di ApoE proteina che come mostrato in figura 26C sono significativamente ridotti negli astrociti WT nucleofettati con il siRNA di SREBP2. Il GCM_{BP2i} ed il GCM_{SCRAM} sono stati aggiunti ai neuroni NS_{HD} dal 4° giorno del differenziamento al 7°. Le cellule sono state fissate ed è stata effettuata l'IC per MAP2 (figura 26D), l'elongazione neuritica con i diversi trattamenti è stata quantificata tramite la macro di ImageJ. Come atteso, il trattamento con il GCM_{BP2i} non ha avuto alcun effetto sulla crescita neuritica ed i valori di elongazione neuritica dei neuroni derivati da NS^{Hdh48Q} e NS^{Hdh140Q} trattati con GCM_{BP2i} sono paragonabili alle rispettive cellule differenziate con il normale medium senza aggiunta di GCM (NT). Contrariamente i neuroni derivati da NS^{Hdh48Q} e NS^{Hdh140Q} trattati con GCM_{SCRAM} mostrano una crescita neuritica significativamente aumentata rispetto ai neuroni differenziati con GCM_{BP2i} o con il medium normale e paragonabile ai valori di elongazione neuritica che si ottengono in seguito alla somministrazione del GCM_{WT} (figura 26E).

Questi risultati rafforzano l'ipotesi che una possibile alterazione dell'attività di SREBP2 possa essere il meccanismo molecolare alla base della disfunzione della sintesi/secrezione di colesterolo negli astrociti HD.

Sovra-espressione della forma attiva di SREBP2 in astrociti primari R6/2

I dati sopra discussi dimostrano un possibile coinvolgimento dell'attività di SREBP astrocitario nell'influenzare le proprietà neuronali colesterolo-dipendenti. Per avere un'ulteriore prova sperimentali di questa ipotesi abbiamo effettuato esperimenti di sovra espressione della forma N-terminale di SREBP2, la porzione del fattore di trascrizione che trasloca nel nucleo, in astrociti HD col fine incrementare la sintesi/efflusso di colesterolo negli astrociti R6/2 e quindi i livelli di ApoE-Colesterolo nel GCM derivato dagli astrociti R6/2 esprimenti la porzione N-terminale del SREBP2 (BP2) (GCM_{R6/2BP2N-ter}). Gli astrociti primari da topi R6/2 sono stati cresciuti in coltura per 14 giorni e dopo sono stati nucleofettati con il plasmide contenente la

porzione N-terminale del SREBP2 ed un plasmide controllo (pcDNA). Dopo 48 ore dalla nucleofezione gli astrociti sono stati messi a contatto con il DMEM F12 da condizionare per 8 ore ed il GCM_{R6/2 BP2N-ter} ed il GCM_{R6/2pcDNA} ottenuti sono stati addizionati al terreno di differenziamento dei neuroni NS_{WT} e NS_{HD} al 4° giorno del differenziamento. (figura 27A). Analisi di ICC per il marcatore MAP2 mostrano come i neuroni NS_{HD} differenziati in presenza del GCM_{R6/2BP2N-ter} mostrano un maggior numero di neuriti positivi a MAP2 rispetto ai neuroni NS_{HD} trattati con il GCM_{R6/2} o con il GCM_{R6/2pcDNA}. (figura 27B). La quantificazione con il Neurite tracer conferma un incremento significativo della crescita neuritica nei neuroni derivati da NS^{Hdh48Q} e NS^{Hdh140Q} differenziate in presenza di GCM_{R6/2 BP2N-ter} rispetto ai neuroni NS_{HD} trattati con il GCM_{R6/2} o con il GCM_{R6/2pcDNA} (figura 27C).

Questi esperimenti corroborano alla tesi che la ridotta attività di SREBP negli astrociti HD potrebbe avere un ruolo chiave nel ridurre il rilascio di ApoE-colesterolo compromettendo la comunicazione tra astrociti e neuroni.

L'identificazione del possibile meccanismo molecolare, e in cellule specifiche (gli astrociti), potrebbe permettere l'identificazione di nuovi bersagli di intervento su cui costruire delle alternative strategie di potenziale interesse terapeutico atte a recuperare una disfunzione che avviene in cellule di supporto ai neuroni che muoiono nella malattia.

DISCUSSIONE

La ricerca condotta nella seconda parte del mio dottorato ha permesso di accrescere le conoscenze su meccanismi cellulari non-autonomi e sul ruolo che gli astrociti hanno nella malattia di Huntington evidenziando come un'alterata comunicazione tra astrociti e neuroni riguardante il metabolismo del colesterolo sia in grado di influenzare attività neuronali durante i diversi stadi dell'HD.

Nell'insieme i risultati ottenuti permettono di comprendere ulteriormente l'impatto della disfunzione della biosintesi di colesterolo nella patogenesi dell'HD focalizzandosi sulle cellule maggiormente coinvolte in questa disfunzione (cioè gli astrociti) e su quei meccanismi che possono influenzare le proprietà neuronali colesterolo-dipendenti non solo in neuroni sani ma soprattutto in neuroni HD. In particolare, si è mostrato che i difetti nella biosintesi/secrezione di colesterolo negli astrociti HD compromette, mediante meccanismi cellulari non autonomi, due importanti proprietà neuronali colesterolo dipendenti, la formazione e il mantenimento delle sinapsi e la crescita assonale e dendritica, contribuendo potenzialmente ad alcuni fenotipi neurologici associati alla malattia. Inoltre gli studi di modulazione genica evidenziano una possibile alterazione del meccanismo di SREBP2 negli astrociti HD e che tale meccanismo contribuisca effettivamente alla minor produzione/secrezione di colesterolo dagli astrociti ai neuroni influenzando la sinaptogenesi e la crescita neuritica nella malattia di HD.

La disfunzione del colesterolo nella Malattia di Huntington è stata ampiamente documentata in precedenti studi fatti nel laboratorio in cui ho svolto il dottorato (Sipione et al., 2002; Valenza et al., 2005; Valenza et al. 2007a; Valenza et al. 2007b).

Un dato interessante emerso da questi lavori riguarda il ruolo dell'huntingtina sana nella biosintesi del colesterolo; misure effettuate nel cervello di topi sovra-espressanti huntingtina sana hanno mostrato un aumento nei livelli e nell'attività di precursori del colesterolo e di enzimi chiave coinvolti nella sua sintesi, suggerendo quindi un coinvolgimento dell'huntingtina nella biosintesi del colesterolo (Valenza et al., 2007).

Queste evidenze sperimentali e la conoscenza sul ruolo cruciale dell'huntingtina ma anche del colesterolo durante lo sviluppo embrionale (Zuccato and Valenza and Cattaneo, 2010), ha portato a ipotizzare che la disfunzione del colesterolo nella malattia di Huntington non sia da imputare esclusivamente ad un meccanismo di gain of function dell'huntingtina mutata.

Nei mammiferi il SNC è il distretto più ricco in colesterolo; contiene da solo il 23 % del colesterolo totale di tutto il corpo nonostante rappresenti solamente il 2 % della massa totale corporea (Wilson et al., 1968). La maggior parte del colesterolo nel SNC è prodotto dagli oligodendrociti, si trova sotto forma non esterificata ed è principalmente localizzata a livello del rivestimento mielinico (Paratcha et al., 2002). Il colesterolo nel cervello non è solamente un componente strutturale delle membrane e della mielina ma è anche fondamentale per

molte funzioni cellulari in quanto definisce le proprietà funzionali delle proteine intrinseche di membrana quali i canali ionici ed i recettori vari (Burger et al., 2000) e, all'interno dei *lipid rafts*, costituisce la piattaforma per l'inizio, la propagazione ed il mantenimento degli eventi di trasduzione del segnale (Paratcha et al., 2002).

Nel cervello adulto il 70% del colesterolo totale è trattenuto nei rivestimenti mielinici e deriva da elevata sintesi durante lo sviluppo, in particolare durante la fase di mielinizzazione. Il tasso di turnover degli steroli nel cervello è dello 0.03 % contro lo 0.7 % del corpo intero (Xie et al., 2003); di conseguenza la sua emivita è stimata essere di circa 5 anni nell'uomo e 4-6 mesi nel topo (Björkhem et al., 1998). La netta riduzione di sintesi del colesterolo dopo gli eventi di mielinizzazione e il lento turnover del colesterolo suggeriscono che la piccola quota giornaliera di colesterolo di neo-sintesi nell'adulto giochi un ruolo importante nelle funzioni neuronali e che un'alterazione della biosintesi basale del colesterolo possa portare a conseguenze gravi nello stadio adulto. Poiché la sintesi di colesterolo nell'adulto è esclusivamente a carico degli astrociti, abbiamo deciso di valutare se la ridotta produzione di colesterolo a carico degli astrociti HD, precedentemente osservata in uno studio effettuato dalla dottoressa Valenza (Valenza et al., 2010), possa influenzare proprietà colesterolo-dipendenti di neuroni sani. Infatti, il colesterolo ha un ruolo primario nella sinaptogenesi ed è essenziale per il rilascio di neurotrasmettitori (Thiele et al., 2000; Mauch et al., 2001). Le vescicole sinaptiche contengono più colesterolo di qualunque altro organello intracellulare incluso i mitocondri ed il reticolo endoplasmatico (Schmitz et al., 2001). Alti livelli di colesterolo sono richiesti per permettere la formazione e la fusione delle vescicole sinaptiche indipendentemente dal loro contenuto (Huttner et al., 2001) e per l'organizzazione della frazione postsinaptica (Lang et al., 2001). In età adulta, quindi, i neuroni hanno bisogno di colesterolo per portare a termine alcune delle loro funzioni come formare e mantenere gli assoni, i dendriti e le connessioni sinaptiche, ma la maggior parte del colesterolo di cui necessitano per svolgere queste attività deriva dagli astrociti. Le proteine coinvolte nell'efflusso di colesterolo dagli astrociti hanno un ruolo chiave nel cervello in questo meccanismo che coinvolge astrociti e neuroni. Come spiegato nell'introduzione, tra le proteine maggiormente coinvolte nel cross-talk tra astrociti e neuroni, ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1) riveste un ruolo cruciale nell'efflusso di colesterolo dagli astrociti a carico delle lipoproteine contenenti ApoE, fornendo colesterolo ai neuroni maturi per le loro attività (Ikonen et al., 2006). La dottoressa Valenza ha dimostrato che in astrociti primari derivati da due diversi modelli murini HD i livelli di RNA messaggero di geni della biosintesi del colesterolo ed i livelli di RNA messaggero di *abca1*, *abcg4* (un altro "ATP-binding cassette transporter" molto espresso nel cervello), e ApoE sono ridotti rispetto ai controlli e rispetto ad astrociti sovra-espressanti l'huntingtina sana, causando una ridotta produzione e un ridotto rilascio di ApoE nel terreno di coltura (Valenza et al. 2010). Questo suggerisce che la presenza di huntingtina mutata causa una riduzione della sintesi/secrezione di colesterolo nel tipo cellulare che principalmente è deputato a tale funzione nel cervello, gli astrociti.

Al fine di valutare se un difetto nella biosintesi del colesterolo nelle cellule gliali esprimenti l'htt mutata possa compromettere, mediante un meccanismo cellulare non autonomo, la formazione ed il mantenimento della sinapsi, la crescita neuritica ed altre funzioni neuronali

contribuendo alla degenerazione neuronale osservata nella Malattia di Huntington, abbiamo, per prima cosa, confermato la ridotta sintesi/secrezione di colesterolo in astrociti primari derivati da topi HD e successivamente abbiamo valutato l'effetto della riduzione del metabolismo del colesterolo astrocitario su proprietà neuronali colesterolo-dipendenti in neuroni derivati da NS_{WT} e NS_{HD} (crescita neuritica) ed in neuroni primari di topi sani (attività sinaptica). Il paradigma sperimentale ha previsto che neuroni derivati da NS e colture primarie di neuroni sono state sottoposte ad un mezzo di coltura condizionato da astrociti sani e HD per misurare rispettivamente i parametri di crescita neuritica ed attività sinaptica. I dati descritti in questa tesi mostrano chiaramente come solo il trattamento con il GCM_{WT}, che contiene adeguati livelli di Apo-colesterolo (figura 18A) produce un effetto positivo sull'elongazione neuritica nei neuroni NS_{HD} (figura 23) e sull'attività sinaptica dei neuroni primari WT sia in termini di incremento di espressione di proteine sinaptiche (figura 24) sia in termini di potenziali elettrici (figura 25). La somministrazione del GCM_{R6/2} alle stesse cellule non provoca alcun effetto benefico sui parametri presi in esame (figura 18A, figura 23, figura 24 e 25).

Inoltre, tramite esperimenti di somministrazione (5µg/ml di colesterolo dal giorno 4 al 7 del differenziamento neuronale) e deplezione di colesterolo (deplezione delle lipoproteine dal GCM_{WT}) su neuroni derivati da NS abbiamo confermato che l'incremento osservato nell'elongazione neuritica nei neuroni NS_{HD} è legato alla presenza di colesterolo e non ad altri elementi presenti nel medium condizionato, quali i fattori di crescita (figura 21). In fine abbiamo dimostrato che i livelli di SREBP2 influenzano a tal punto l'efflusso del colesterolo dagli astrociti che il GCM raccolto dagli astrociti HD in seguito a sovra-espressione della porzione N-terminale di SREBP2 promuove l'elongazione neuritica e differenza del GCM_{R6/2} derivato da astrociti R6/2 nucleofettati con il pcDNA (plasmide controllo) (figura 27). Esperimenti di silenziamento genico di SREBP2 tramite siRNA negli astrociti WT dove si osserva una ridotta quantità di ApoE nel GCM corrispettivo (GCM_{BP2i}) e mancato incremento della crescita neuritica dei neuroni HD trattati con GCM_{BP2i} ma non nei neuroni trattati con GCM_{WT} o GCM_{SCRA} (controllo positivo) (figura 26), confermano il possibile coinvolgimento di SREBP2 nella ridotta sintesi/secrezione di colesterolo negli astrociti HD con conseguente effetto sul cross talk astrociti-neuroni e in fine sulle attività neuronali colesterolo dipendenti.

Inoltre, è importante rilevare che le diverse popolazioni neuronali nelle diverse aree cerebrali richiedono differenti quantità di colesterolo e la riduzione di questa molecola può avere effetti diverse in base alle aree colpite (Pfrieger et al., 2003). Gli astrociti quindi devono fornire diverse dosi di colesterolo in base alla loro localizzazione cerebrale, ad esempio, la quantità di colesterolo necessario allo striato durante lo sviluppo è il circa il doppio a quella necessario alla corteccia ed all'ippocampo (Zhang et al., 1996), ed elevati livelli di colesterolo nello striato rispetto alla corteccia sono stati misurati anche del cervello bovino di 9 mesi (Runquist et al., 1995). La necessità di elevati livelli di colesterolo nello striato può derivare dalla particolare anatomia/funzione di questa area cerebrale che è caratterizzata da numerose interconnessioni e afferenza sinaptiche che richiedono un'elevata disponibilità di colesterolo (San Jose et al., 2001). Queste evidenze supportano l'idea che la disfunzione del colesterolo a livello astrocitario può contribuire alla neurodegenerazione striatale osservata nella malattia di

Huntington. Ad oggi, il ruolo degli astrociti nella patogenesi della malattia di Huntington è stato analizzato quasi esclusivamente dal gruppo di Li. Nel 2005 Shin et al. hanno dimostrato che l'espressione dell'huntingtina mutata solo in cellule gliali a P1 contribuisce alla disfunzione neuronale in HD (Shin et al., 2005). Questo dato è rafforzato in Bradford et al., 2009 dove il gruppo di Li dimostra come l'espressione dell'huntingtina mutata nelle cellule gliali di topi sani provoca neurodegenerazione che peggiora con il progredire dell'età (Bradford et al, 2009). Dai dati descritti in questa tesi e dalle evidenze sperimentali riportate, possiamo quindi affermare che nel cervello adulto il colesterolo ha un ruolo importantissimo nel mantenimento delle funzioni neuronali tramite un meccanismo cellulare non autonomo che prevede il crosstalk neuroni-astrociti.

I risultati discussi in questa tesi forniscono un nuovo punto di vista sul coinvolgimento del colesterolo negli eventi patologici alla base della malattia di Huntington e pongono l'attenzione sulle cellule realmente coinvolte, gli astrociti.

Tuttavia, rimangono ancora delle questioni da chiarire per esempio sui tempi di comparsa della disfunzione del colesterolo nella malattia di Huntington. In questo elaborato di tesi abbiamo approfondito l'importante funzione del colesterolo nel cervello adulto, ma in realtà il colesterolo ha un ruolo molto più consistente durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Se il colesterolo, come è stato già ricordato, è prodotto soprattutto nell'età post-natale come si spiega l'insorgenza tardiva di questa disfunzione nella malattia di Huntington. Inoltre, la maggior parte delle malattie neurodegenerative associate ad un difetto del colesterolo insorgono in età precoce, in quanto le alterazioni a carico dei geni chiave coinvolti nella biosintesi del colesterolo provocano numerose malformazioni durante lo sviluppo del cervello nei mammiferi (Porter FD, 2002). A tal proposito, evidenze sperimentali hanno dimostrato che alcune disfunzioni osservate in soggetti presintomatici per la malattia di Huntington (pre-HD) o in pazienti a stadi precoci della patologia possono essere associate ad un difetto precoce del metabolismo del colesterolo. Per esempio, studi sul recettore A2A nel sangue umano hanno mostrato un'attività aberrante del recettore in soggetti pre-HD rispetto ai controlli sani (Varani et al., 2003). La disfunzione dell'attività del recettore A2A e di altri recettori, che risultano alterati in stadi precoci della malattia di Huntington, può essere associata ad un'alterazione della fluidità della membrana dovuta ad un difetto del metabolismo colesteroligenico. Inoltre, uno studio sulla diminuzione del volume della materia bianca con conseguente disfunzione neuronale in soggetti pre-HD (Ciarmiello et al., 2006), potrebbe essere associata ad un difetto della biosintesi del colesterolo in stadi precoci della patologia. A supporto di questa tesi, il gruppo di Krainc ha recentemente mostrato che la presenza dell'huntingtina mutata in oligodendrociti primari provoca una riduzione di PGC1 α e del suo target Hmgcr e della proteina base della mielina (MBP). La diminuzione di MBP e del Hmgcr provoca un deficit nel processo di mielinizzazione in topi HD-R6/2 adulti e suggerisce un difetto della sintesi del colesterolo e quindi della formazione della guaina mielinica in stadi post-natali (Xiang et al., 2011). Queste osservazioni portano alla possibile conclusione che un'alterazione della sintesi del colesterolo a livello post natale provoca una lenta e progressiva perdita di funzionalità neuronale durante la vita adulta e quindi gli stadi della patologia. A questa teoria si affianca ormai una tesi sempre

più consolidata che la sintesi di colesterolo giornaliera che avviene a livello celebrale, per quanto minima e a carico quasi esclusivo degli astrociti, è indispensabile alla sopravvivenza ed alla funzionalità dei neuroni (Pfrieger and Ungerer, 2011). Quindi non possiamo escludere che la corraborazione di un'alterazione della biosintesi del colesterolo in stadi precoci con il difetto nella sintesi/secrezione di colesterolo da parte degli astrociti HD in fase adulta possa contribuire in modo significativo alla disfunzione neuronale osservata nella malattia di Huntington.

CONCLUSIONI

Gli esperimenti sopra descritti hanno permesso di comprendere se e come un'alterata comunicazione riguardante la sintesi e l'efflusso del colesterolo tra astrociti e neuroni possa influenzare attività neuronali nella malattia di Huntington. Inoltre forniscono ulteriori informazioni per accrescere le nostre conoscenze su meccanismi cellulari non-autonomi e sul ruolo cruciale che gli astrociti hanno nell'HD.

Dai dati mostrati è possibile concludere che:

- la disfunzione del colesterolo nella malattia di Huntington ha un impatto importante sull'alterazione di attività neuronali colesterolo-dipendenti quali la crescita neuritica e l'attività sinaptica
- le cellule maggiormente coinvolte nei difetti della biosintesi di colesterolo sono gli astrociti e la riduzione del trasporto/efflusso di colesterolo da parte degli astrociti HD compromette, mediante meccanismi cellulari non autonomi, la funzionalità neuronale corroborando ai processi di neurodegenerazione osservati nella Malattia di Huntington.
- la modulazione di SREBP, fattore di trascrizione che regola i geni della sintesi di colesterolo, sembra influenzare la produzione/secrezione di colesterolo degli astrociti ai neuroni influenzando la crescita neuritica, proprietà neuronali dipendenti dal colesterolo di origine astrocitaria.

Nell'insieme i risultati ottenuti permettono di comprendere ulteriormente l'impatto della disfunzione della biosintesi di colesterolo nella patogenesi dell'HD focalizzandosi sulle cellule maggiormente coinvolte in questa disfunzione (gli astrociti) e su quei meccanismi che possono influenzare le proprietà neuronali colesterolo-dipendenti, come la sinaptogenesi e la crescita neuritica, non solo in neuroni sani ma soprattutto in neuroni HD.

L'identificazione di un possibile meccanismo per modulare la sintesi/efflusso di colesterolo in cellule specifiche (gli astrociti), potrebbe facilitare l'identificazione di nuove strategie di potenziale interesse terapeutico atte a recuperare una disfunzione che avviene in cellule di supporto ai neuroni che muoiono nella malattia.

Inoltre, i dati mostrati ampliano le conoscenze riguardanti il cross-talk astrociti e neuroni e i meccanismi molecolari alla base della sintesi di colesterolo nel cervello, argomento poco approfondito ma che sta acquisendo sempre più rilevanza nel mondo scientifico.

MATERIALI E METODI

Studio Sperimentale

I campioni di sangue utilizzati per le analisi sono stati raccolti presso *l'Institute of neurology MCR Prion Unit and University College of London*, presso *l'Henri Mondor Hospital, Créteil (Francia)*, presso *l'Istituto Nazionale Neurologico IRCCS "Carlo Besta" di Milano* e presso *l'IRCCSI Istituto Auxologico Italiano di Milano*. Per le diverse analisi i campioni derivati dai diversi centri sono stati divisi in gruppi; i campioni Italiani sono stati divisi in 3 gruppi (A, B per le misure di BDNF proteina nel siero; C per l'analisi dei livelli di mRNA da sangue totale), così come i campioni Inglesi (A, per le analisi sul plasma; B,C per le misure su sangue totale). I campioni Francesi sono stati analizzati come unico gruppo per analizzare i livelli di BDNF proteina nel plasma. In tabella 1-2 sono raccolte tutte le informazioni cliniche e genetiche dei 138 controlli, 56 pre-manifest HD, e 205 pazienti HD analizzati per un totale di 398 campioni. I tessuti cerebrali autoptici analizzati sono stati forniti dall'*Harvard Brain Tissue Resource center (HBTRC)* (Belmont, MA, USA). E' stata utilizzata la corteccia parietale di 10 soggetti affetti dalla Malattia di Huntington e 10 soggetti sani comparabili per parametri quali età e sesso. Il tessuto utilizzato rappresenta una casistica dei possibili gradi di malattia (grado 2-3-4). Per i campioni Huntington la cui lunghezza del CAG non è stata fornita dalla banca americana, si è proceduto ad una genotipizzazione presso il laboratorio di Genetica Molecolare della divisione di Biochimica e Genetica dell'Istituto Carlo Besta di Milano, in accordo con i metodi pubblicati per lo studio delle malattie da triplette (Gellera et al., 1996). La lunghezza media del CAG dei pazienti Huntington è pari a 45.

Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico di ciascuno dei due centri clinici coinvolti nello studio. Tutti coloro che hanno partecipato alla donazione del sangue sono stati messi a conoscenza delle finalità della sperimentazione e hanno firmato un consenso informato. Per i pazienti le cui capacità cognitive sono risultate deteriorate il certificato di consenso è stato firmato da un tutore.

Criteria di reclutamento di pazienti e controlli

I requisiti tenuti in considerazione per il reclutamento dei partecipanti alla sperimentazione sono stati i seguenti:

- Controlli (CT): volontari sani, non affetti da disturbi neurodegenerativi o da altre patologie croniche, non sottoposti a trattamenti farmacologici prolungati nel tempo.
- Soggetti pre-sintomatici (preHD): individui con più di 35 ripetizioni della tripletta CAG, senza alcun sintomo clinico della patologia, con i seguenti punteggi nelle scale cliniche di valutazione della malattia, TFC (Total Function Capacity)=13 e UHDRS (Unified

Huntington's Disease Rating Scale) <2 .

- Pazienti sintomatici (HD): Pazienti positivi al test molecolare per la presenza di un numero di ripetizioni della tripletta CAG maggiore di 35 nel gene codificante per la proteina Huntingtina, con patologia conclamata. Lo stadio clinico della malattia è stato determinato mediante la scala di valutazione motoria UHDRS e mediante il punteggio TFC secondo le specifiche di Marder (Marder et al.,2000).

Prelievo dei campioni di sangue e processamento

Per i pazienti ed i soggetti controllo dell' Henri Mondor Hospital, Creteil, e del Neurological Institute-IRCCS "Carlo Besta" di Milano e del From UCL Institute of Neurology, London, i campioni di sangue sono stati prelevati tra le ore 8.30 e le ore 10 del mattino in condizioni di digiuno. Mentre i campioni di sangue collezionati dall'IRCCS Istituto Auxologico Italiano di Milano derivano da soggetti non a digiuno.

Plasma

I campioni di plasma del Gruppo Francese sono stati raccolti in tubi trattati con EDTA tra le 9:00 e 12:00 della mattina. I pazienti HD , i soggetti pre-HD ed i controlli sono stati reclutati per il prelievo lo stesso giorno. I 5ml di sangue sono stati mantenuti sul bancone a temperatura ambiente per 4-5 ore prima della separazione del Plasma. Il plasma è stato ottenuto tramite centrifugazione a 3000xg per 20 minuti e subito conservato a -80°C in aliquote da 1ml.

Anche i campioni di plasma del Gruppo A Londinese sono stati raccolti in tubi trattati con EDTA ma tra le 14 e le 17. I campioni di sangue sono stati mantenuti a temperatura ambiente per solo 2 ore prima della lavorazione. Il sangue è stato trasferito in tubi histopaque (Sigma Aldrich) che incrementano la separazione del plasma dalle componenti cellulari. Il plasma è stato ottenuto tramite centrifugazione di 10 minuti a 10000xg e conservato a -80°C in aliquote da 1ml.

Siero

I campioni di siero del Gruppo A Italiano sono stati collezionati tra le 9:00e le 12:00 di mattina in condizioni di non digiuno. I 3ml di sangue sono stati mantenuti per 1 ora a temperatura ambiente ed il siero è stato ottenuto dopo una centrifugata i 10 minuti a 2000xg. I campioni sono stati conservati in aliquote da 150µl a -80°C.

I 3ml di sangue del Gruppo B Italiano sono stati prelevati tra le 9:00 e le 12:00 del mattina in condizioni di digiuno. Il sangue è stato mantenuto per 1 ora a temperatura ambiente ed il siero e' stato ottenuto dopo una centrifugata i 10 minuti a 2000xg. I campioni sono stati conservati in aliquote da 150µl a -80°C.

RNA

I campioni del Gruppo Inglese B e C Inglese e del Gruppo C italiano sono stati collezionati con la stessa procedura. 2,5 mL di sangue venoso sono stati prelevati dalla vena cubitale dei

pazienti e di soggetti controllo, e sono stati raccolti in provette contenenti additivi stabilizzanti (PAXgene™ Blood RNA Tube, PreAnalytiX). I reagenti contenuti nelle provette di raccolta proteggono le molecole di RNA dalla degradazione da parte delle RNasi e minimizzano i cambiamenti *ex vivo* dell'espressione genica. I campioni sono stati trasportati nel nostro laboratorio e qui sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA.

BDNF ELISA

I livelli di BDNF proteina nei campioni di plasma e siero sono stati misurati tramite il kit BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega). Al fine di ridurre le variazioni tra i campioni dovute alla variabilità sperimentale, tutti i campioni sono stati misurati contemporaneamente e con lo stesso lotto del kit ELISA. Inoltre in ogni analisi erano inseriti sia il BDNF standard del kit ELISA che serviva per la formazione della curva standard indispensabile per la quantificazione del BDNF nei campioni, sia un campione di riferimento presente in ogni piastra. Le aliquote di siero e plasma sono state scongelate lo stesso giorno dell'esperimento alle 9:00 del mattino. Il plasma è stato diluito 1:20 in PBS1x; il siero è stato diluito in 1:300 in PBS1x. I livelli di BDNF nei campioni di siero e plasma sono stati misurati in 3 indipendenti esperimenti di ELISA. Per ogni esperimento di ELISA i campioni sono stati misurati in triplicato. L'assorbanza a 450nm è stata valutata tramite Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader.

Estrazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA dai campioni di sangue intero è stata fatta ricorrendo all'utilizzo del PAXgene™ BLOOD RNA KIT della PreAnalytiX BD Company. Prima dell'inizio della procedura di purificazione dell'RNA i campioni di sangue devono essere lasciati almeno 2 ore a temperatura ambiente per assicurare la completa lisi delle cellule. Il kit prevede anche il trattamento per 15 minuti con DNasi per rimuovere le tracce di DNA rimaste nella colonna

L'RNA totale di corteccia è isolato da 200-300 mg di tessuto umano usando 2 mL di una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato chiamata TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). I campioni vengono omogenati in potter di vetro al fine di frammentare il tessuto e determinare la lisi cellulare mantenendo l'integrità degli acidi nucleici. Per l'estrazione di RNA da cellule il Trizol è stato utilizzato in una quantità pari a 1ml direttamente nella flask da 25 cm² o a 500µl in wells di multiewell da 6 e poi raccolto in eppendorf. Ai campioni tissutali omogenati ed alle eppendorf contenenti i campioni cellulari sono stati successivamente aggiunti 200µL di cloroformio per millilitro di TRIZOL REAGENT utilizzato, i campioni vengono centrifugati a 4°C per 15 minuti alla velocità di 10.000 rpm. Dopo aver recuperato la fase acquosa si effettua la precipitazione dell'RNA con etanolo assoluto freddo. Per incrementare l'efficienza di precipitazione i campioni vengono addizionati di 2 µL di soluzione di glicogeno (10mg/mL) e vengono lasciati a -80°C per 12 ore. Dopo aver centrifugato i campioni a 4°C, per 10 minuti a 10000 rpm, il surnatante viene rimosso e il pellet di RNA è lavato con 1 mL di etanolo al 75%, l'RNA estratto viene risospeso in 50 µL di acqua pura. Il DNA genomico presente nei campioni di RNA estratto da corteccia è digerito

utilizzando 1 U di DNaseI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) per 1mg/mL di RNA totale e incubando i campioni a 37°C per 10 minuti. Per verificare la qualità dell'RNA estratto, i campioni sono stati analizzati tramite corsa su gel d'agarosio all'1% e l'RNA presente in ogni campione è stato quantizzato utilizzando NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). I campioni di RNA sono così conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Retrotrascrizione dell'RNA

L'RNA viene retrotrascritto a cDNA mediante l'enzima *Superscript III Reverse Transcriptase RNAsi H-* (Invitrogen). Ogni reazione impiega 250 ng di random primers, 1 µL di DTT 0,1 M, 1µL di dNTPs 10mM, 4µL di buffer 5X contenente Tris-HCl 250mM, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM e infine 200U di Superscript III in un volume finale di 20 µL. Il cDNA ottenuto è conservato a -20°C. La quantità di RNA retrotrascritta è di 250 ng. Due diverse reazioni di retro trascrizione sono state effettuate su ogni campione di RNA.

PCR Qualitativa

Le PCR qualitative del BDNF totale in sangue e corteccia e del GAPDH (figura 1) sono effettuata in un volume totale di 50 µL, contenenti 4 µL di cDNA (ottenuto da una retrotrascrizione di 1000ng di RNA) e una miscela composta da: Buffer 10X (conc. finale 1X), MgCl₂ 50 mM (conc. finale 1,5 mM), dNTPs 2,5 mM (conc. finale 0,2 mM), Primer forward 10 mM (conc. finale 0,4 mM), Primer reverse 10 mM (conc. finale 0,4 mM), TAQ polymerase (Invitrogen) 5U/µL (conc. finale 2,5U/µL).

I primers del BDNF, disegnati sulla sequenza codificante (numero d'accesso NCBI AF411339) sono:

BDNF primer Fw 5'-TAACGGCGGCAGACAAAAAGA-3';

BDNF primer Rev 5'-GAAGTATTGCTTCAGTTGGCCT-3',

Il prodotto di amplificazione ha una lunghezza di 101 paia di basi.

I primers del GAPDH (numero d'accesso NCBI NC_000012.10) sono:

GAPDH primer Fw 5'-AGCTGAACGGGAAGCTCACT-;

GAPDH primer Rev 5'-AGGTCCACCACTGACACGTTG-3'La lunghezza dell'amplificato è di 67 paia di basi.

Il protocollo d'amplificazione è il seguente: 94°C, 5 minuti, 35 cicli suddivisi in tre fasi: una prima fase a 94°C per 1 minuto, una seconda fase di 45 secondi a 60°, un'ultima fase di amplificazione da 45 secondi a 72°C. Il protocollo di PCR termina con 7 minuti a 72°C.

La reazione è condotta su un volume finale di 50µL

Real-time PCR

Tre indipendenti analisi di PCR sono state condotte su le due reazioni di retro trascrizione per un totale di 6 indipendenti misure effettuate per ogni campione di RNA. La PCR quantitativa

Real time utilizzata per queste analisi è un'iCycler Thermal Cycler with a multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). Le misure sono state effettuate in un volume finale di reazione pari a 25 μ L in cui si trovano 5 ml di cDNA (diluizione 1:10 dalla reazione di retro trascrizione per l'amplificazione dei geni BDNF, ROCK1, ANXA1, GAPDH, B2M e β actin ed una diluizione 1:200 dalla reazione di retro trascrizione per l'amplificazione delle EAR), primers forward e reverse 0,2mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.4, dNTPs 0,2mM, iTaq DNA polimerasi 25 units/mL, MgCl₂ 3 mM, SYBR Green I, fluoresceina 10 nM e stabilizzanti inclusi nell'iQTM SYBR Green Supermix-Biorad. Il protocollo di PCR Real-time consiste in una iniziale denaturazione a 95°C della durata di 3 minuti, seguita da 45 cicli costituiti ognuno da una fase di denaturazione a 95°C di 30 secondi, una fase di appaiamento a 60°C di 30 secondi e una fase di allungamento a 72°C anch'essa di 30 secondi. La fluorescenza è quantificata durante la fase di *annealing* a 60°C ed l'amplificazione del corretto amplicone è confermata dall'analisi della curva di Melting (55°C–94°C).

Le sequenze dei primer, il numero d'accesso della sequenza su cui sono stati disegnati, la temperatura di melting e la lunghezza dell'amplicato sono consultabili nelle pubblicazioni Marullo et al., 2010 e Zuccato et al, 2011.

I primers per SREPB2 (numero di accesso NCBI NM_033218.1) sono i seguenti:

SREPB2 primer Fw: GCCTCTCCTTTAACCCCTTG

SREPB2 primer Rev: CCAGTCAAACCAGCCCCCAG

La lunghezza attesa dell'amplicato è di 131 paia di basi.

Culture cellulari

Negli esperimenti sono state utilizzate cellule neurali Staminali (NS) derivate da cellule embrionali staminali (ES) nel nostro laboratorio (Conti et al., 2005). Le cellule NS si duplicano ogni 24-30 ore e sono mantenute in coltura nel medium Euromed-N (Euroclone, Celbio) contenente 5mg/ml di glutammina (Gibco, Invitrogen), 5mg/ml di penicillina/streptomycin (Gibco, Invitrogen), addizionato del supplemento N2 all'1% (Gibco, Invitrogen) e dei fattori di crescita EGF (PeproTech) e FGF- 2 (PeproTech), entrambi in concentrazione 20ng/ml (medium di proliferazione) (Conti et al., 2005). Quando raggiungono la confluenza le cellule sono dissociate per esposizione ad una soluzione di Accutase (Sigma) per qualche minuto a 37°C. Le cellule vengono risospese in PBS sterile (Sigma) e centrifugate per 3 minuti a 1200rpm. Eliminato il surnatante, il pellet viene risospeso nel medium di proliferazione ad una densità corrispondente a circa 2 milioni di cellule in una flask da 25 cm² (diluizione 1:4 a giorni alterni).

Differenziamento neuronale in vitro

Le cellule NS sono state differenziate in senso neuronale attraverso un protocollo messo a punto in laboratorio (Conti et al., 2005; Spiliotopoulos et al., 2009). Il differenziamento neuronale prevede una prima induzione alla neuralizzazione di 3 giorni durante la quale 1.5 milioni di cellule sono piastrate in una flask da 25 cm² in un medium di pre-differenziamento,

detto medium D1 composto dall'Euromed-N complementato con il B27 1% + N2 0,5% + FGF-2 10ng/ml (DIV 0, day in vitro). Per il differenziamento terminale, al DIV3, le cellule sono state piastrate su plastica rivestita da laminina. Le piastre di coltura sono state incubate con laminina, diluita in PBS sterile freddo (3µg/ml), per circa 3 ore a 37°C. Le cellule vengono piastrate ad una densità pari a 90000-100000 cellule/cm² ed esposte al medium D2 in cui il medium Euromed-N e' sostituito con i medium NeuroBasal:DMEM F12 (Invitrogen) nel rapporto 3:1 addizionati con il B27 1% + N2 0,5% + FGF-2 10ng/ml + BDNF 20ng/ml. Al DIV 6, il protocollo prevede la sostituzione del terreno D2 con il D3 composto ancora dal NeuroBasal:DMEM F12 nel rapporto 3:1 ma implementato con una maggior quantità di BDNF e meno FGF-2 (B27 1% + N2 0,5% + FGF-2 5ng/ml + BDNF 30ng/ml). Le cellule sono poi mantenute in queste condizioni fino al giorno 7. I trattamenti con i diversi GCM vengono effettuati al 4 giorno di differenziamento con un medium composto dal NeuroBasal:GCM in rapporto 3:1 e normalmente complementato con i fattori di crescita.

Differenziamento astrocitario in vitro

Le cellule NS sono state indotte al differenziamento astrocitario tramite l'utilizzo del Siero fetale bovino (FBS). 1 milione di cellule sono state piastrate in flask da 25 cm² in terreno di proliferazione. Il giorno successivo alla piastratura è stata effettuata la sostituzione del medium di proliferazione cellulare con il medium GMEM (Invitrogen) contenente 5mg/ml di glutammina (Gibco, Invitrogen), 5mg/ml di penicillina/streptomicina (Gibco, Invitrogen) ed il 10% di FBS (Euroclone). Le cellule sono poi mantenute in queste condizioni fino al giorno 14, operando dei cambi medium ogni 4 giorni del differenziamento. Il medium condizionato dalla glia (GCM) utilizzato negli esperimenti e' generato al 14 giorno di differenziamento astrocitario. Il DMEM F12 è condizionato per 8 ore a contatto con gli astrociti derivati dalle NS e successivamente viene raccolto, suddiviso in aliquote e conservato a -80°C fino all'utilizzo.

Culture Primarie

Astrociti Primari

Gli astrociti primari sono stati derivati da cervelli totale di topi a 2 giorni post-natale (P2). In seguito alla dissezione, il cervello e' stato inizialmente disgregato meccanicamente in PBS 1X con un bisturi e successivamente con Tripsina (Gibco, Invitrogen) per qualche minuto a 37°C. Le cellule vengono risospese in PBS + FBS per inattivare la tripsina e centrifugate per 3 minuti a 1200rpm. Eliminato il surnatante, il pellet viene risospeso nel medium di differenziamento composto da GMEM (Invitrogen) contenente 5mg/ml di glutammina (Gibco, Invitrogen), 5mg/ml di penicillina/streptomicina (Gibco, Invitrogen) ed il 20% di FBS (Euroclone). Le cellule sono mantenute in questo medium per i primi 4 giorni di derivazione in vitro. Al 5 DIV gli astrociti vengono mantenuti in coltura nello stesso medium contenente una minor percentuale di FBS (FBS 10%) operando dei cambi medium ogni 6 giorni.

Il GCM utilizzato negli esperimenti è generato al 18DIV degli astrociti. Il DMEM F12 è messo a condizionare per 8 ore a contatto con gli astrociti e successivamente viene raccolto, suddiviso in aliquote e conservato a -80°C fino all'utilizzo.

Neuroni Primari

Per la derivazione dei neuroni primari in vitro sono stati sacrificati embrioni di topo alla stato embrionale di 18.5 giorni (E18.5). Il cervello è stata dissezionato e la corteccia è stata utilizzata per la generazione di neuroni corticali in vitro. La corteccia è stata dissociata con una soluzione di PBS + BSA 1mg/ml + Glucosio 5mM + DNAsi (Sigma) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contenente 1mg/ml di Papaina per 15 minuti a 37°C . Le cellule vengono risospese in DMEM F12 (Invitrogen) e centrifugate per 3 minuti a 1200rpm. Eliminato il surnatante, il pellet viene risospeso nel medium di differenziamento composto da DMEM F12 complementato con B27 2% e le cellule vengono piastrate su plastica rivestita da polilisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). I neuroni vengono mantenuti in coltura nello stesso medium fino a DIV10 operando dei cambi medium ogni 4 giorni del differenziamento.

I trattamenti con i diversi GCM vengono effettuati al 4DIV con un medium composto dal DMEM F12:GCM in rapporto 1:1 e normalmente complementato con B27 al 2%.

Saggi di modulazione di SREBP2 RNA interferente

Per il silenziamento di SREBP2 (BP2) ed il relativo controllo (scrambled siRNA), sono stati utilizzati 300nM di siRNA (Santa Cruz). Gli astrociti primari derivati da topi sani sono stati trasfettati, dopo 18DIV, con il siRNA per BP2 (BP2_i) e con il siRNA controllo (scrambled) tramite il kit Amaxa Mause Neural Stem Cell (programma T-020). In maniera simile, la sovra espressione della porzione N-terminale di SREBP2 negli astrociti HD è stata effettuata tramite nucleofezione del plasmide contenente SREBP2 N-terminale tramite il kit Amaxa Mause Neural Stem Cell (programma T-020).

Analisi di Immunocitochimica

Per la caratterizzazione cellulare mediante analisi di immunofluorescenza, le cellule sono state fissate con paraformaldeide (Sigma) al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente. Al termine della fissazione, le cellule vengono lavate in PBS tre volte e permeabilizzate per 10 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di PBS e 0.5% di Triton X-100. Al termine della permeabilizzazione, le cellule vengono incubate per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione di bloccaggio (0.3% di Triton X-100, 2.5% di FCS diluiti in PBS). Successivamente, le cellule vengono incubate ON a 4°C con l'anticorpo primario di interesse (GFAP, BD 1:500; S100 β , SIGMA 1:200; MAP2, BD 1:500; Sinapsina, SYSY 1:100; Sinaptogamina, SYSY 1:100). Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, le cellule vengono lavate tre volte in PBS ed incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario opportuno e con l'Hoescht 33258 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Molecular Probes, Invitrogen), un colorante nucleare. Gli anticorpi secondari utilizzati sono tutti Alexafluor 488 o Alexafluor 568 (Molecular Probes, Invitrogen) diluiti 1:500 in PBS. Le cellule vengono lavate tre volte con PBS ed analizzate al microscopio a

fluorescenza tramite LAS-AF imaging software al microscopio rovesciato Leica DMI 6000B. Le ICC dei neuroni primari sono state analizzate al microscopio confocale LSM510 Meta system (Zeiss) con un obiettivo 63× e con risoluzione di 1024 × 1024 dei pixel; per ogni immagine 8 di 10 sezioni acquisite (con spessore di 0.7µm a sezione) sono state utilizzate per ottenere il z-projection tramite il software ImageJ.

SDS-PAGE e Western Blot

I livelli cellulari e nel medium di Apo-E e delle proteine sinaptiche nei neuroni corticali primari sono stati valutati tramite Western Blot. Il DMEM-F12 condizionato 8H con gli astrociti è stato raccolto e concentrato 10 volte con apposite tubi Amicon Ultra-4 filter (Millipore). Le cellule sono state lisate in un buffer contenente 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1% Triton-100 (Sigma), PMSF (1:250), e inibitori della proteasi (1:100, Sigma) and successivamente centrifugate a 10,000 × *g* per 10 min. Un uguale volume di lisato cellulare e di medium (proveniente dalle stesse cellule) sono stati caricati su un gel denaturante di acrilamide (SDS) al 10% e trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad). Dopo trasferimento su nitrocellulosa e incubazione con una soluzione di bloccaggio (latte delipidato 5%) la stessa è stata incubata con l'anticorpo primario Anti-ApoE (goat anti-ApoE polyclonal, 1:800, Millipore Bioscience Research Reagents) per 2H a temperatura ambiente. Per le proteine sinaptiche la membrana è stata incubata con anticorpi monoclonali anti-Sinapsina (SYSY 1:1000), anti-PSD95 (SYSY 1:2000), anti-Sinaptogamina (SYSY 1:1000) e anti-Sinaptofisina (SYSY 1:1000) Dopo vari lavaggi in TBSt le nitrocellulose sono state incubate con l'anticorpo secondario hrp (Horse Radish Peroxidase, 1:3000, Bio-Rad). I livelli intracellulari di α -tubulin detectati tramite un anticorpo monoclonale per α -tubulin (1:5000; Sigma-Aldrich), sono stati usati per normalizzare i livelli di ApoE cellulari e i livelli delle proteine sinaptiche nei neuroni corticali primari. Il segnale è stato poi rilevato con il kit Supersignal West Pico. L'analisi densitometriche sono state effettuate con il Quantity One (Bio-Rad). La membrana è stata inoltre incubata con il Coomassie per quantificare i livelli di proteina nel medium.

Elettrofisiologia

Le indagini elettrofisiologiche sono state effettuate utilizzando la tecnica del *whole-cell patch-clamp*. Tale tecnica prevede l'utilizzo di micropipette in vetro borosilicato con una punta con resistenza di 0.5-2.0 M Ω , forgiate a partire da capillari di vetro borosilicato (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany) mediante l'utilizzo di un *puller* (P-97, Sutter instruments CO.). La micropipetta così ottenuta è riempita di una soluzione intracellulare (composta in (mM) da 130 K-Gluconato, 4 NaCl, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 5 CP, 2 Na₂ATP, 0.3 Na₃GTP, con il pH portato a 7.3 mediante KOH) iso-osmotica al citoplasma per mantenere la continuità elettrochimica e al suo interno è successivamente inserito un elettrodo di argento clorurato che è collegato ad un amplificatore da *patch-clamp*. Il tutto è fissato ad un supporto (*holder*) e può muoversi mediante l'utilizzo di micromanipolatori. La punta della micropipetta è posizionata a contatto della superficie della membrana cellulare; applicando una suzione è

possibile generare una pressione negativa che porta alla formazione di un sigillo (*seal*) ad alta resistenza (ordine dei $G\Omega$). In questo modo l'area di membrana a contatto con la superficie della micropipetta è elettricamente isolata e il contributo delle correnti di fuga (*leakage*) è trascurabile. La configurazione di *whole-cell* si ottiene a partire dalla configurazione di *cell-attached* mediante l'applicazione di ulteriori piccole suzioni in modo che il tassello di membrana all'interno della punta della micropipetta si rompa e si venga a creare una continuità diretta tra il citoplasma cellulare e la soluzione intracellulare contenuta nella micropipetta. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente (22-24°C) e durante la procedura di registrazione le cellule sono state poste in una soluzione salina composta in (mM) da 140 NaCl, 10 glucosio, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, con il pH portato a 7.4 mediante NaOH. Le registrazioni sono state effettuate utilizzando un amplificatore Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA, USA) e digitalizzate utilizzando un convertitore DigiData 1332a AD/DA (Axon Instruments Inc.). Stimolazioni ed acquisizioni dei dati sono state condotte con il software Clampex del pacchetto pClamp (Axon Instruments Inc., Burlingame, CA, USA), mentre per l'analisi è stato utilizzato il programma Clampfit (Axon Instruments, Foster City CA, USA).

Analisi statistica e rappresentazione dei dati

Poiché i valori del BDNF non hanno una distribuzione normale, per l'analisi statistica è stato utilizzato il *two-tailed U-test di Mann Whitney* o il Kruskal-Wallis test seguito dal Dunn's Multiple comparison test, saggi statistici non parametrici, che permette di valutare se due campionamenti provengono dalla stessa popolazione o da popolazioni diverse.

La significatività che porta ad attribuire i campionamenti a due popolazioni differenti si ha a valori di $p < 0,05$.

In ogni figura, la linea del box più vicina allo zero indica il 25° percentile, la linea entro il box rappresenta la mediana e la linea più lontana dallo zero indica il 75° percentile. Quando i campioni analizzati sono più di 10 nel grafico sono riportate anche delle linee che rappresentano il 10° e il 90° percentile. Per le correlazioni sono stati usati test Unpaired t-test e Spearman's rank.

I dati relativi alla Parte II della tesi sono stati analizzati usando i seguenti metodi statistici: *One-way ANOVA* con il test di comparazione multipla *Newman-Keuls* ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

BIBLIOGRAFIA

- Abildayeva, K., et al., 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2006 May. 281(18):12799-808.
- Akaneya, Y., et al., *Brain-derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex*. *J Neurosci*, 1997. 17(17): p. 6707-16.
- Albin, R.L. and D.A. Tagle, *Genetics and molecular biology of Huntington's disease*. *Trends Neurosci*, 1995. 18(1): p. 11-4.
- Albin, R.L., et al., *Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease*. *N Engl J Med*, 1990. 322(18): p. 1293-8.
- Ali, N.J. and M.S. Levine, *Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits occur early in the R6/2 mouse model of Huntington's disease*. *Dev Neurosci*, 2006. 28(3): p. 230-8.
- Almqvist, E., et al., *Ancestral differences in the distribution of the delta 2642 glutamic acid polymorphism is associated with varying CAG repeat lengths on normal chromosomes: insights into the genetic evolution of Huntington disease*. *Hum Mol Genet*, 1995. 4(2): p. 207-14.
- Altar, C.A., et al., *Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain*. *Nature*, 1997. 389(6653): p. 856-60.
- Altar, C.A., et al., *Cell body infusions of brain-derived neurotrophic factor increase forebrain dopamine release and serotonin metabolism determined with in vivo microdialysis*. *Adv Pharmacol*, 1998. 42: p. 915-21.
- Andresen, J.H., et al., *Nicotine affects the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the hippocampus of hypoxic newborn piglets*. *J Perinat Med*, 2009. 37(5): p. 553-60.
- Andrew, S.E., et al., *The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease*. *Nat Genet*, 1993. 4(4): p. 398-403.
- Apostol, B.L., et al., *CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice*. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Sep. 39(1):8-20.
- Arancibia, S., et al., *Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats*. *Neurobiol Dis*. 2008 Sep. 31(3):316-26.
- Auerbach, W., et al., *The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin*. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(22): p. 2515-23.
- Ayache, S., et al., *Comparison of proteomic profiles of serum, plasma, and modified media supplements used for cell culture and expansion*. *J Transl Med*. 2006 Oct 4;4:40.
- Aylward, E.H., et al., *Longitudinal change in basal ganglia volume in patients with Huntington's disease*. *Neurology*, 1997. 48(2): p. 394-9.
- Aylward, E.H., et al., *Rate of caudate atrophy in presymptomatic and symptomatic stages of Huntington's disease*. *Mov Disord*, 2000. 15(3): p. 552-60.
- Aylward, E.H., et al., *Caudate volume as an outcome measure in clinical trials for Huntington's disease: a pilot study*. *Brain Res Bull*, 2003. 62(2): p. 137-41.
- Aylward, E.H., *Change in MRI striatal volumes as a biomarker in preclinical Huntington's disease*. *Brain Res Bull*, 2007. 72(2-3): p. 152-8.
- Ballas, N., et al., *Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology* *Nat Neurosci*. 2009 Mar;12(3):311-7.
- Baquet, Z.C., J.A. Gorski, and K.R. Jones, *Early striatal dendrite deficits followed by neuron*

- loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, 2004. 24(17): p. 4250-8.
- Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. *Embo J*, 1982. 1(5): p. 549- 53.
- Batchelor, P.E., et al., *Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor*. *J Neurosci*, 1999. 19(5): p. 1708-16.
- Battaile K.P., Steiner RD. Smith-Lemli-Opitz syndrome: the first malformation syndrome associated with defective cholesterol synthesis. *Mol Genet Metab* 2000;71(1-2):154-62.
- Batzer, M.A. and P.L. Deininger, *Alu repeats and human genomic diversity*. *Nat Rev Genet*, 2002. 3(5): p. 370-9.
- Beal, M. F., et al., *Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?* *TINS* 1993. 16, 125-131.
- Bekinschtein, P., et al., *BDNF and memory formation and storage*. *Neuroscientist*, 2008. 14(2): p. 147-56.
- Bekinschtein, P., et al., *BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(7): p. 2711-6.
- Bence, N.F., R.M. Sampat, and R.R. Kopito, *Impairment of the ubiquitin- proteasome system by protein aggregation*. *Science*, 2001. 292(5521): p. 1552-5.
- Benn, C.L., et al., *Glutamate receptor abnormalities in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington's disease*. *Neuroscience*, 2007. 147(2): p. 354-72.
- Bjorkhem, I., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation*. *J Lipid Res* 1998;39(8):1594-600.
- Binder, D.K., et al., *BDNF and epilepsy: too much of a good thing?* *Trends Neurosci*, 2001. 24(1): p. 47-53.
- Bohanna, I., et al., *Magnetic resonance imaging as an approach towards identifying neuropathological biomarkers for Huntington's disease*. *Brain Res Rev*, 2008. 58(1): p. 209-25.
- Borovecki, F., et al., *Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(31): p. 11023-8.
- Borrell-Pages, M., et al., *Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies*. *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(22): p. 2642-60.
- Bradford, J., et al., *Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 29.106(52):22480-5.
- Bramham, C.R. and E. Messaoudi, *BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis*. *Prog Neurobiol*, 2005. 76(2): p. 99-125.
- Brown MS, Goldstein JL, Dietschy JM. *Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. Comparison with the rate of cholesterol synthesis in different physiological states*. *J Biol Chem* 1979;254(12):5144-9.
- Burger K, Gimpl G, Fahrenholz F. *Regulation of receptor function by cholesterol*. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(11):1577-92.
- Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. *J Mol Endocrinol*, 2000. 25(2): p. 169-93.
- Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. *J Mol Endocrinol*, 2002. 29(1): p. 23-39.
- Canals, J.M., et al., *Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease*. *J Neurosci*, 2004. 24(35): p. 7727-39.
- Cattaneo, E., et al., *Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research*. *Trends Neurosci*, 2001. 24(3): p. 182-8.

- Ceccatelli, S., et al., *Expanded distribution of mRNA for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the rat brain after colchicine treatment.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(22): p. 10352-6.
- Cepeda, C., et al., *NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease.* J Neurosci Res, 2001. 66(4): p. 525-39.
- Cha, J.H., et al., *Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999. 354(1386): p. 981-9.
- Cha, J.H., *Transcriptional signatures in Huntington's disease.* Prog Neurobiol, 2007. 83(4): p. 228-48.
- Chang, D.T., et al., *Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons.* Neurobiol Dis, 2006. 22(2): p. 388-400.
- Chen, Z.Y., et al., *Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons.* J Neurosci, 2004. 24(18): p. 4401-11.
- Ciammola, A., et al., *Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007. 144B(4): p. 574-7.
- Ciarmiello A, Cannella M, Lastoria S, et al., *Brain white-matter volume loss and glucose hypometabolism precede the clinical symptoms of Huntington's disease.* J Nucl Med, 2006;47(2):215-22.
- Conforti, P., et al., *Blood level of brain-derived neurotrophic factor mRNA is progressively reduced in rodent models of Huntington's disease: restoration by the neuroprotective compound CEP-1347.* Mol Cell Neurosci, 2008. 39(1): p. 1-7.
- Conti, L., Pollard S. M., et al., *Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell.* PLoS Biol., 2005. 3(9): e283.
- Cooper, J.K. et al., *Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture.* Hum Mol Genet., 1998. 7:783-790.
- Corder, E.H., Saunders AM, Strittmatter WJ, et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.* Science, 1993. 261(5123):921-3.
- Cowan, C.M., et al., *Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntington disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity.* J Neurosci, 2008. 28(48): p. 12725-35.
- Cummings DM, Cepeda C, Levine MS. *Alterations in striatal synaptic transmission are consistent across genetic mouse models of Huntington's disease.* ASN Neuro. 2010 Jun 18;2(3):e00036.
- Dalrymple, A., et al., *Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates.* J Proteome Res, 2007. 6(7): p. 2833-40.
- Davies, S.W., et al., *Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation.* Cell, 1997. 90(3): p. 537-48.
- Dheda, K., et al., *Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR.* Biotechniques, 2004. 37(1): p. 112-4, 116, 118-9.
- Diekmann, H., et al., *Decreased BDNF levels are a major contributor to the embryonic phenotype of huntingtin knockdown zebrafish.* J Neurosci. 2009 Feb 4. 29(5):1343-9.
- Dietschy, J.M., Turley S.D., *Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal.* J Lipid Res 2004. 45(8):1375-97.
- DiFiglia, M., *Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease.* Trends Neurosci, 1990. 13(7): p. 286-9.
- DiFiglia, M., et al., *Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons.* Neuron, 1995. 14(5): p. 1075- 81.

- DiFiglia, M., et al., *Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain*. Science, 1997. 277(5334): p. 1990-3.
- Diogenes, M.J., et al., *Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices*. J Neurosci, 2004. 24(12): p. 2905-13.
- Dragatsis, I., A. Efstratiadis, and S. Zeitlin, *Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues*. Development, 1998. 125(8): p. 1529-39.
- Dragatsis, I., P. Dietrich, and S. Zeitlin, *Expression of the Huntingtin-associated protein 1 gene in the developing and adult mouse*. Neurosci Lett, 2000. 282(1-2): p. 37-40.
- Duan, W., et al., *Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(5): p. 2911-6.
- Dugich-Djordjevic, M.M., et al., *Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain*. Eur J Neurosci, 1995. 7(9): p. 1831-9.
- Dunah, A.W., et al., *Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease*. Science, 2002. 296(5576): p. 2238-43.
- Durr, A. (1999) Homozygosity in Huntington's disease. J Med Genet. 36:172-173.
- Duyao, M., et al., *Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease*. Nat Genet, 1993. 4(4): p. 387-92.
- Ferrante, R.J., et al., *Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease*. Brain Res, 1987. 411(1): p. 162-6.
- Ferrer, I., et al., *Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease*. Brain Res, 2000. 866(1-2): p. 257-61.
- Figurov, A., et al., *Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus*. Nature, 1996. 381(6584): p. 706-9.
- Fletcher, J.M., et al., *Design of a conformationally defined and proteolytically stable circular mimetic of brain-derived neurotrophic factor*. J Biol Chem, 2008. 283(48): p. 33375-83.
- Frank, L., et al., *BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons*. Eur J Neurosci, 1996. 8(6): p. 1220-30.
- Frim, D.M., et al., *Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions*. Neuroreport, 1993. 4(4): p. 367-70.
- Frisen, J., et al., *Characterization of glial trkB receptors: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(11): p. 4971-5.
- Fujimura, H., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation*. Thromb Haemost, 2002. 87(4): p. 728-34.
- Fusco, F.R., et al., *Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease*. J Neurosci, 1999. 19(4): p. 1189-202.
- Fusco, F.R., et al., *Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain*. Eur J Neurosci, 2003. 18(5): p. 1093-102.
- Futter, M., et al., *Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors*. J Med Genet. 2009 Jul. 46(7):438-46.
- Galiegue, S., et al., *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. Eur J Biochem, 1995. 232(1): p. 54-61.
- Gardian, G., et al., *Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease*. J Biol Chem, 2005. 280(1): p. 556-63.
- Gaura, V., et al., *Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients*. Brain, 2004. 127(Pt 1): p. 65-72.
- Gauthier, L.R., et al., *Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by*

- enhancing BDNF vesicular transport along microtubules.* Cell, 2004. 118(1): p. 127-38.
- Gerard, C.M., et al., *Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis.* Biochem J, 1991. 279 (Pt 1): p. 129-34.
- Gervais, F.G., et al., *Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi.* Nat Cell Biol, 2002. 4: 95-105, 2002.
- Gharami, K., et al., *Brain-derived neurotrophic factor over-expression in the forebrain ameliorates Huntington's disease phenotypes in mice.* J Neurochem, 2008. 105(2): p. 369-79.
- Godin, J.D., et al., *Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis.* Neuron. 2010 Aug 12. 67(3):392-406.
- Goldberg, Y.P., et al., *Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract.* Nat Genet, 1996. 13(4): p. 442-9.
- Gonul, A.S., et al., *The effect of antidepressant treatment on N-acetyl aspartate levels of medial frontal cortex in drug-free depressed patients.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2006 Jan. 30(1):120-5.
- Graham, R.K., et al., *Cleavage at the 586 amino acid caspase-6 site in mutant huntingtin influences caspase-6 activation in vivo.* J Neurosci. 2010 Nov 10. 30(45):15019-29.
- Grassi-Oliveira, R., et al., *Low plasma brain-derived neurotrophic factor and childhood physical neglect are associated with verbal memory impairment in major depression--a preliminary report.* Biol Psychiatry. 2008 Aug 15. 64(4):281-5.
- Gray, M., et al., *Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice.* J Neurosci, 2008. 28(24): p. 6182- 95.
- Grillo, R.W., et al., *Reduced serum BDNF levels in schizophrenic patients on clozapine or typical antipsychotics.* J Psychiatr Res, 2007. 41(1-2): p. 31-5.
- Gunawardena, S., et al., *Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in Drosophila.* Neuron, 2003. 40(1): p. 25-40.
- Gusella, J.F. et al. (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234-238.
- Hacein-Bey-Abina, S., et al., *Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1.* J Clin Invest, 2008. 118(9): p. 3132-42.
- Hackam A.S., et al., *Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain.* J Biol Chem, 2000. 275: 41299-41308.
- Han, J.C., et al., *Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome.* N Engl J Med, 2008. 359(9): p. 918-27.
- Heerssen, H.M., M.F. Pazyra, and R.A. Segal, *Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons.* Nat Neurosci, 2004. 7(6): p. 596-604.
- Henshall, T.L., et al., *Selective neuronal requirement for huntingtin in the developing zebrafish.* Hum Mol Genet. 2009 Dec 15. 18(24):4830-42.
- Her, L.S. and L.S. Goldstein, *Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin.* J Neurosci, 2008. 28(50): p. 13662-72.
- Ho, L.W., et al., *Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease.* J Med Genet, 2001. 38(7): p. 450-2.
- Hockly, E., et al., *Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice.* Ann Neurol, 2002. 51(2): p. 235-42.
- Hodges, A., et al., *Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain.* Hum Mol Genet, 2006. 15(6): p. 965- 77.
- Hodgson, J.G., Agopyan N, Gutekunst CA, et al., *A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration.* Neuron 1999. 23(1):181-92.
- Horton, J.D., *Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis.* Biochem Soc Trans 2002. 30(Pt 6):1091-5.

- Huntington's Disease Collaborative Research Group *A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome.* Cell 1993. 72:971-983.
- Huttner, W.B., Zimmerberg J. *Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission.* Curr Opin Cell Biol 2001. 13(4):478-84.
- Ikeda, Y., et al., *Low serum levels of brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor in patients with chronic schizophrenia.* Schizophr Res. 2008. 101(1-3): p. 58-66.
- Ivkovic, S. and M.E. Ehrlich, *Expression of the striatal DARPP-32/ARPP- 21 phenotype in GABAergic neurons requires neurotrophins in vivo and in vitro.* J Neurosci, 1999. 19(13): p. 5409-19.
- Jarabek, B.R., R.P. Yasuda, and B.B. Wolfe, *Regulation of proteins affecting NMDA receptor-induced excitotoxicity in a Huntington's mouse model.* Brain, 2004. 127(Pt 3): p. 505-16.
- Jiang, H. et al., *Cell death triggered by polyglutamine-expanded huntingtin in a neuronal cell line is associated with degradation of CREB-binding protein.* Hum Mol Genet. 2003. 12:1-12.
- Johnson, R., et al., *A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease.* Neurobiol Dis, 2008. 29(3): p. 438-45.
- Jovanovic, J.N., et al., *Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release.* Nat Neurosci, 2000. 3(4): p. 323-9.
- Karege, F., et al., *Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity.* Biol Psychiatry, 2005. 57(9): p. 1068-72.
- Karege, F., et al., *Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients.* Psychiatry Res, 2002. 109(2): p. 143- 8.
- Kim, Y.J., et al., *Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(22): p. 12784-9.
- Kivipelto, M., et al., *Hypertension and hypercholesterolaemia as risk factors for Alzheimer's disease: potential for pharmacological intervention.* CNS Drugs 2002. 16(7):435-44.
- Knusel, B., et al., *Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons.* Neuroscience, 1997. 78(3): p. 851-62.
- Kojro, E., et al., *Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10.* Proc Natl Acad Sci U S A 2001. 98(10):5815-20.
- Lang, T., et al., *SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis.* Embo J 2001. 20(9):2202-13.
- Laske, C., et al., *BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls.* J Psychiatr Res, 2007. 41(5): p. 387-94.
- Laske, C., et al., *Decreased brain-derived neurotrophic factor (BDNF)- and beta-thromboglobulin (beta-TG)- blood levels in Alzheimer's disease.* Thromb Haemost, 2006. 96(1): p. 102-3.
- Laske, C., et al., *Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease.* J Neural Transm, 2006. 113(9): p. 1217-24.
- Leavitt, B.R., et al., *Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo.* Am J Hum Genet, 2001. 68(2): p. 313-24.
- Laske, C., et al., *BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls.* J Psychiatr Res, 2007. 41(5): p. 387-94.
- Ledesma, M.D., Dotti, C.G., *Amyloid excess in Alzheimer's disease: What is cholesterol to be blamed for?* FEBS Lett 2006.
- Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.* Science, 2001. 294(5548): p. 1945-8.
- Leoni, V., et al., *Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington's disease.* Brain, 2008. 131(Pt 11): p. 2851-9.

- Leoni, V., et al., *Whole body cholesterol metabolism is impaired in Huntington's disease*.
- Lessmann, V., K. Gottmann, and M. Malsangio, *Neurotrophin secretion: current facts and future prospects*. Prog Neurobiol, 2003. 69(5): p. 341- 74.
- Leyhe, T., et al., *Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early Alzheimer's disease*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2008. 258(2): p. 124-8.
- Li, S.H. and X.J. Li, *Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats*. Hum Mol Genet, 1998. 7(5): p. 777- 82.
- Li, S.H., et al., *Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1*. Mol Cell Biol, 2002. 22(5): p. 1277-87.
- Li, S.H. and X.J. Li, *Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease*. Trends Genet, 2004. 20(3): p. 146-54.
- Lindholm, D., *Role of neurotrophins in preventing glutamate induced neuronal cell death*. J Neurol, 1994. 242(1 Suppl 1): p. S16-8.
- Liu, Y.F. et al. (1997) SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. *J Biol Chem*. 272:8121-8124.
- Lommatzsch, M., et al., *The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma*. Neurobiol Aging, 2005. 26(1): p. 115-23.
- Lonze, B.E., et al., *Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system*. Neuron. 2002 Aug 15. 35(4), 605-23.
- Luthi-Carter, R., et al., *Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain*. Hum Mol Genet, 2002. 11(17): p. 1911-26.
- Lutjohann, D., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S- hydroxycholesterol from the brain into the circulation*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996. 93(18):9799-804.
- Maccarrone, M. et al. *The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases*. Prog Neurobiol, 2007. 81(5-6): p. 349-79.
- Mangiarini, L., et al., *Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice*. Cell 1996. 87(3):493-506.
- Mantamadiotis, T., et al., *Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration*. Nat Genet. 2002. 31(1), 47-54.
- Marder, K., et al., *Rate of functional decline in Huntington's disease*. Huntington Study Group. Neurology, 2000. 54(2): p. 452-8.
- Marsicano, G., et al., *CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity*. Science. 2003 Oct 3;302(5642):84-8.
- Martin, J.B. and J.F. Gusella, *Huntington's disease. Pathogenesis and management*. N Engl J Med, 1986. 315(20): p. 1267-76.
- Martindala, D., et al., *Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates*. Nature genetics 20, 1998. 150-154.
- Martinez-Serrano, A. and A. Bjorklund, *Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells*. J Neurosci, 1996. 16(15): p. 4604-16.
- Marullo, M., et al., *Analysis of the Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor/Neuron-Restrictive Silencer Factor Occupancy of Non-Neuronal Genes in Peripheral Lymphocytes from Patients with Huntington's Disease*. Brain Pathol, 2008.
- Marullo, M, et al., *Expressed Alu repeats as a novel, reliable tool for normalization of real-time quantitative RT-PCR data*. Genome Biol. 2010 Jan 28. 11(1):R9.
- Matrisciano, F., et al., *Changes in BDNF serum levels in patients with major depression disorder (MDD) after 6 months treatment with sertraline, escitalopram, or venlafaxine*. J Psychiatr Res, 2009. 43(3): p. 247-54.
- Mattson, M.P., et al., *Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior*. Neurobiol Aging, 2002. 23(5): p. 695-

705.

Mauch, D.H., et al., *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. *Science* 2001;294(5545):1354- 7.

Mitoma, M., et al., *Stress at work alters serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and plasma 3-methoxy-4- hydroxyphenylglycol (MHPG) levels in healthy volunteers: BDNF and MHPG as possible biological markers of mental stress?* *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2008. 32(3): p. 679-85.

Mizuno, K., J. Carnahan, and H. Nawa, *Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons*. *Dev Biol*, 1994. 165(1): p. 243-56.

Molero, A.E., et al., *Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2009 Dec 22;106(51):21900-5.

Monteleone, P., et al., *Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity*. *Psychosom Med*, 2004. 66(5): p. 744-8.

Mori, T., et al., *Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice*. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001. 60(8):778-85.

Murer, M.G., Q. Yan, and R. Raisman-Vozari, *Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. *Prog Neurobiol*, 2001. 63(1): p. 71-

Myers, R.H. et al. (1991) Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol*. 50:729-742.

Nakahashi, T., et al., *Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor*. *FEBS Lett*, 2000. 470(2): p. 113-7.

Nakajima, K., et al., *Neurotrophins regulate the function of cultured microglia*. *Glia*, 1998. 24(3): p. 272-89.

Nakao, N., et al., *Protective effects of BDNF and NT-3 but not PDGF against hypoglycemic injury to cultured striatal neurons*. *Exp Neurol*, 1995. 131(1): p. 1-10.

Nasir, J., et al., *Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes*. *Cell*, 1995. 81(5): p. 811-23.

Nucifora, F.C, et al., *Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp- mediated transcription leading to cellular toxicity*. *Science*, 2001 291: 2423-2428.

O'Gorman, M.R., et al., *Flow cytometric analyses of the lymphocyte subsets in peripheral blood of children with untreated active juvenile dermatomyositis*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995 Mar. 2(2):205-8.

O'Kusky, J.R., et al., *Neuronal degeneration in the basal ganglia and loss of pallido-subthalamic synapses in mice with targeted disruption of the Huntington's disease gene*. *Brain Res* 1999. 818:468-479.

O'Mullan P, Craft D, Yi J, Gelfand CA. *Thrombin induces broad spectrum proteolysis in human serum samples*. *Clin Chem Lab Med*. 2009. 47(6):685-93.

Orr, A.L., et al., *N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking*. *J Neurosci*, 2008. 28(11): p. 2783-92.

Orth, M., et al., *Mitochondria and degenerative disorders*. *Am J Med Genet* 2001. 106(1), 27-36.

Pan, W., et al., *Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier*. *Neuropharmacology*. 1998 Dec. 37(12):1553-61.

Panov, A.V., et al., *Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines*. *Nat Neurosci*, 2002. 5(8): p. 731-6

Paratcha G, Ibanez CF. *Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme*. *Curr Opin Neurobiol* 2002. 12(5):542-9.

Pardridge, W.M., *Molecular trojan horses for blood-brain barrier drug delivery*. *Discov Med*,

2006. 6(34): p. 139-43.

Paulsen, J.S., et al., *Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. 79(8): p. 874-80.

Pavese, N., et al., *Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study*. Neurology, 2006. 66(11): p. 1638-43.

Pedersen, B.K., et al., *Role of Exercise-Induced Bdnf Production in the Regulation of Energy Homeostasis*. Exp Physiol, 2009.

Perez-Navarro, E., et al., *Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo*. Neuroscience, 1999. 91(4): p. 1257-64.

Perez-Navarro, E., et al., *Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease*. J Neurochem, 2000. 75(5): p. 2190-9.

Pfriege, F.W., *Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system*. Cell Mol Life Sci 2003. 60(6):1158-71.

Pfriege, F.W., Ungerer, N., *Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes*. Prog Lipid Res. 2011 Oct. 50(4):357-71.

Piccinni, A., et al., *Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments*. J Affect Disord, 2008. 105(1-3): p. 279-83.

Popoli, P., et al., *Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A2A receptors in Huntington's disease*. Prog Neurobiol, 2007. 81(5-6): p. 331-48.

Porter, J.A., Young KE, Beachy PA. *Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development*. Science 1996. 274(5285):255-9.

Porter, F.D., *Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis*. J Clin Invest 2002. 110(6):715-24.

Pruunsild, P., et al., *Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters*. Genomics, 2007. 90(3): p. 397-406.

Radka, S.F., et al., *Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay*. Brain Res, 1996. 709(1): p. 122-301.

Ranen, N.G., et al., *Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease*. Am J Hum Genet, 1995. 57(3): p. 593-602.

Rangone, H., et al., *The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin*. Eur J Neurosci, 2004. 19(2): p. 273-9.

Reiner, A., et al., *Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(15): p. 5733-7.

Repa, J.J., et al., *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta*. Genes Dev. 2000 Nov 15;14(22):2819-30.

Rigamonti, D., et al., *Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3*. J Neurosci, 2000. 20(10): p. 3705-13.

Rigamonti, D., et al., *Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing*. J Biol Chem, 2001. 276(18): p. 14545-8.

Rigamonti, D., et al., *Loss of huntingtin function complemented by small molecules acting as repressor element 1/neuron restrictive silencer element silencer modulators*. J Biol Chem, 2007. 282(34): p. 24554-62.

Roback, J.D., et al., *BDNF-activated signal transduction in rat cortical glial cells*. Eur J Neurosci, 1995. 7(5): p. 849-62.

Rosas, H.D., et al., *Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-*

- based morphometric analysis*. *Neurology*, 2003. 60(10): p. 1615-20.
- Rosas, H.D., A.S. Feigin, and S.M. Hersch, *Using advances in neuroimaging to detect, understand, and monitor disease progression in Huntington's disease*. *NeuroRx*, 2004. 1(2): p. 263-72.
- Rosas, H.D., et al., *Regional cortical thinning in preclinical Huntington disease and its relationship to cognition*. *Neurology*, 2005. 65(5): p. 745- 7.
- Rosas, H.D., et al., *Diffusion tensor imaging in presymptomatic and early Huntington's disease: Selective white matter pathology and its relationship to clinical measures*. *Mov Disord*, 2006. 21(9): p. 1317-25.
- Rosenberg, N.K., et al., *Neuropsychological characteristics of Huntington's disease carriers: a double blind study*. *J Med Genet*. 1995 Aug. 32(8):600-4.
- Rudge, J.S., et al., *Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes*. *Eur J Neurosci*, 1994. 6(5): p. 693-705.
- Runne, H., et al., *Analysis of potential transcriptomic biomarkers for Huntington's disease in peripheral blood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(36): p. 14424-9.
- Runquist, M., et al., *Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain*. *J Neurochem* 1995. 65(5):2299-306.
- Ryu, J.K., et al., *Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease*. *Neurobiol Dis*, 2004. 16(1): p. 68-77.
- Saher, G., et al., *High cholesterol level is essential for myelin membrane growth*. *Nat Neurosci* 2005. 8(4):468-75.
- Sanchez, I., et al. (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421:373-379.
- San Jose, I., et al., *Reduction of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytes in some brain areas of old hairless rhino-j mice (hr-rh-j)*. *Neurosci Lett* 2001. 309(2):81-4.
- Saudou, F., et al., *Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions*. *Cell*, 1998. 95(1): p. 55-66.
- Schenone, A., et al., *Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes*. *J Neuroimmunol*, 1996. 64(2): p. 141-9.
- Schinder, A.F., B. Berninger, and M. Poo, *Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation*. *Neuron*, 2000. 25(1): p. 151-63.
- Schmitz, G., Orso E. *Intracellular cholesterol and phospholipid trafficking: comparable mechanisms in macrophages and neuronal cells*. *Neurochem Res* 2001. 26(8-9):1045-68.
- Schuhmann, B., et al., *A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development*. *J Neuroimmunol*, 2005. 163(1-2): p. 15-23.
- Sennvik, K., et al., *Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients*. *Neurosci Lett* 2000. 278(3):169-72.
- Seppi, K., et al., *Riluzole in Huntington's disease (HD): an open label study with one year follow up*. *J Neurol*, 2001. 248(10): p. 866-9.
- Shimizu, E., et al., *Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants*. *Biol Psychiatry*, 2003. 54(1): p. 70-5.
- Shimizu, E., et al., *Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenia are indistinguishable from controls*. *Neurosci Lett*, 2003. 351(2): p. 111-4.
- Shimoata, T., et al., *Interaction of expanded polyglutamine stretches with nuclear transcription factor leads to aberrant transcriptional regulation in polyglutamine diseases*. *Neuropathology* 2000. 20, 326-333.
- Simmons, D.A., et al., *Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(12): p. 4906-11.
- Simons, .M, et al., *Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95(11):6460-4.

- Sipione, S., et al., *Early transcriptional profiles in huntingtin inducible striatal cells by microarray analysis*. *Hum. Mol. Genet* 2002. 11:1953-1965.
- Slipczuk, L., et al., *BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation*. *PLoS One*, 2009. 4(6): p. e6007.
- Slow, E.J., et al., *Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease*. *Hum Mol Genet* 2003. 12(13):1555-67.
- Smith, R., P. Brundin, and J.Y. Li, *Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(17): p. 1901-12.
- Snell, R.G., et al., *Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease*. *Nat Genet*, 1993. 4(4): p. 393-7.
- Spiliotopoulos, D., Goffredo, D., et al., *An optimized experimental strategy for efficient conversion of embryonic stem (ES)-derived mouse neural stem (NS) cells into a nearly homogeneous mature neuronal population*. *Neurobiol Dis* 2009. 34(2): 320-31.
- Spires, T.L., et al., *Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism*. *J Neurosci*, 2004. 24(9): p. 2270-6.
- Steffan, J.S., et al., *SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology*. *Science*, 2004. 304(5667): p. 100-4.
- Steffan, J.S., et al., *Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila*. *Nature*, 2001. 413(6857): p. 739-43.
- Sugars, K.L., et al., *Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis*. *J Biol Chem*, 2004. 279(6): p. 4988-99.
- Suzuki, T., P.J. Higgins, and D.R. Crawford, *Control selection for RNA quantitation*. *Biotechniques*, 2000. 29(2): p. 332-7.
- Takei, N., et al., *Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats*. *J Neurochem*, 1997. 68(1): p. 370-5.
- Takei, N., et al., *Brain-derived neurotrophic factor induces rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons*. *J Biol Chem*, 1998. 273(42): p. 27620-4.
- Tanaka, T., H. Saito, and N. Matsuki, *Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus*. *J Neurosci*, 1997. 17(9): p. 2959-66.
- Teng, H.K., et al., *ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin*. *J Neurosci*, 2005. 25(22): p. 5455-63.
- Thiele, C., et al., *Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles*. *Nat Cell Biol* 2000. 2(1):42-9.
- Timmusk, T., et al., *Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element*. *J Biol Chem*, 1999. 274(2): p. 1078-84.
- Tint, G.S., et al., *Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. *N Engl J Med* 1994. 330(2):107-13.
- Trajkovska, V., et al., *Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data*. *Brain Res Bull*, 2007. 73(1-3): p. 143-9.
- Trushina, E., et al., *Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro*. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(18): p. 8195-209.
- Underwood, B.R., et al., *Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles*. *Brain*, 2006. 129(Pt 4): p. 877-86.
- Valenza, M., et al., *Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease*. *J Neurosci*, 2005. 25(43): p. 9932-9.
- Valenza, M., et al., *Cholesterol biosynthesis pathway is disturbed in YAC128 mice and is modulated by huntingtin mutation*. *Hum Mol Genet*, 2007. 16(18): p. 2187-98.

- Valenza, M., et al., *Progressive dysfunction of the cholesterol biosynthesis pathway in the R6/2 mouse model of Huntington's disease*. *Neurobiol Dis*, 2007. 28(1): p. 133-42.
- Valenza, M., et al., *Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: is Huntington's disease in the list?* *Prog Neurobiol*, 2006. 80: 165-176, 2006.
- Valenza, M., et al., *Cholesterol defect is marked across multiple rodent models of Huntington's disease and is manifest in astrocytes*. *J Neurosci*. 2010 Aug 11. 30(32):10844-50.
- Valenza, M., Cattaneo, E., *Emerging roles for cholesterol in Huntington's disease*. *Trends Neurosci*. 2011 Sep. 34(9):474-86.
- Van Dellen, A., et al., *Delaying the onset of Huntington's in mice*. *Nature*, 2000. 404(6779): p. 721-2.
- Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol*, 2002. 3(7): p. RESEARCH0034.
- Varani, K., et al., *Aberrant amplification of A(2A) receptor signaling in striatal cells expressing mutant huntingtin*. *Faseb J*, 2001. 15(7): p. 1245- 7.
- Varani, K., et al., *Aberrant A2A receptor function in peripheral blood cells in Huntington's disease*. *Faseb J*, 2003. 17(14): p. 2148-50.
- Ventimiglia, R., et al., *The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro*. *Eur J Neurosci*, 1995. 7(2): p. 213-22.
- Vonsattel, J.P. *Neuropathological classification of Huntington's disease*. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985. 44:559-577.
- Vonsattel, J.P. and M. DiFiglia, *Huntington disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998. 57(5): p. 369-84.
- Wardle, R.A. and M.M. Poo, *Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport*. *J Neurosci*, 2003. 23(25): p. 8722-32.
- Wasser, C.R., Kavalali, E.T., *Leaky synapses: regulation of spontaneous neurotransmission in central synapses*. *Neuroscience*. 2009 Jan 12;158(1):177-88.
- Wellington, C.L., et al., *Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract*. *J Biol Chem*, 1998. 273(15): p. 9158- 67.
- Wellington, C.L., et al., *Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells*. *J Biol Chem*, 2000. 275(26): p. 19831-8.
- Westlake, T.M., et al., *Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains*. *Neuroscience*, 1994. 63(3): p. 637-52.
- Wexler, N.S. et al., *Homozygotes for Huntington's disease*. *Nature* 1987. 326:194-7.
- White, J.K., et al., *Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion*. *Nat Genet*, 1997. 17(4): p. 404-10.
- Wilson, J.D., Lindsey CA, Dietschy JM. *Influence of dietary cholesterol on cholesterol metabolism*. *Ann N Y Acad Sci* 1968. 149(2):808-21.
- Wolf, R.C., et al., *Dorsolateral prefrontal cortex dysfunction in presymptomatic Huntington's disease: evidence from event-related fMRI*. *Brain*, 2007. 130(Pt 11): p. 2845-57.
- Wolf, R.C., et al., *[Functional imaging of cognitive processes in Huntington's disease and its presymptomatic mutation carriers]*. *Nervenarzt*, 2008. 79(4): p. 408-20.
- Woo, N.H., et al., *Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression*. *Nat Neurosci*, 2005. 8(8): p. 1069-77.
- Xiang, Z., et al., *Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α contributes to dysmyelination in experimental models of Huntington's disease*. *J Neurosci*.

2011 Jun. 31(26):9544-53

Xie, C., et al., *Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration.* J Lipid Res 2003. 44(9):1780-9.

Zala, D., et al., *Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vector coding for a mutant huntingtin fragment.* Neurobiol Dis, 2005. 20(3): p. 785-98.

Zeitlin, S., et al., *Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue.* Nat Genet, 1995. 11(2): p. 155-63.

Zeron, M.M., et al., *Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease.* Neuron, 2002. 33(6): p. 849-60.

Zhang, Y., et al., *Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases.* J Neurochem. 2003 Oct. 87(1):101-6.

Zhang, X., L. Ding, and A.J. Sandford, *Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR.* BMC Mol Biol, 2005. 6(1): p. 4.

Zhang, Y., et al., *Huntingtin inhibits caspase-3 activation.* Embo J, 2006. 25(24): p. 5896-906.

Zimelman, J.L., et al., *fMRI detection of early neural dysfunction in preclinical Huntington's disease.* J Int Neuropsychol Soc, 2007. 13(5): p. 758-69.

Zuccato, C., et al., *Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease.* Science, 2001. 293(5529): p. 493-8.

Zuccato, C., et al., *Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes.* Nat Genet, 2003. 35(1): p. 76-83.

Zuccato, C., et al., *Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery.* Pharmacol Res, 2005. 52(2):133-9.

Zuccato, C. and E. Cattaneo, *Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease.* Prog Neurobiol, 2007. 81(5-6): p. 294-330.

Zuccato, C., et al., *Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease.* Brain Pathol, 2008. 18(2): p. 225-38.

Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E., *Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease.* Physiol Rev. 2010 Jul. 90(3):905-81.

FIGURE E TABELLE

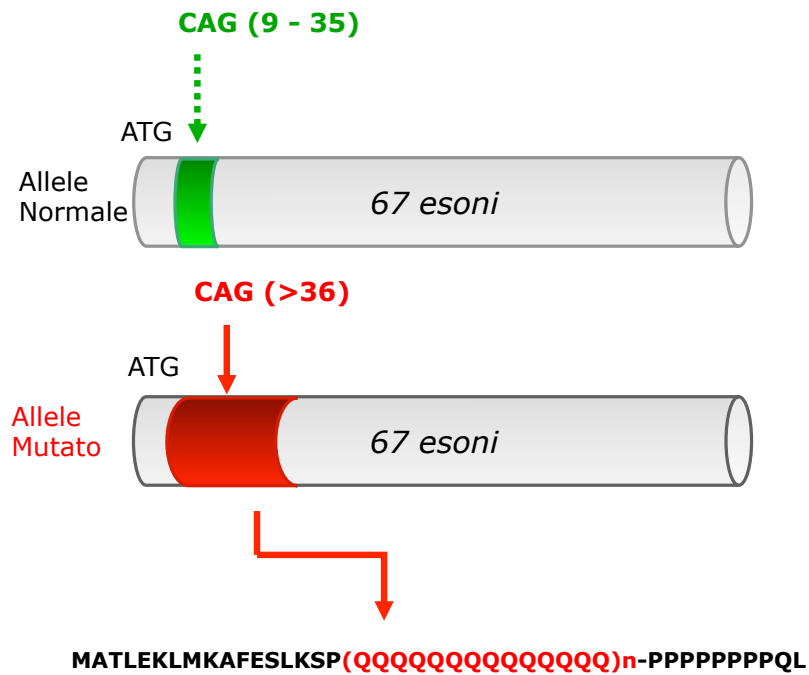


Figura 1. Gene *IT15* codificante per l'*huntingtina*: evidenziata la sequenza nucleotidica CAG localizzata nel primo esone del gene *IT15* la cui espansione oltre le 36 triplette è responsabile dell'insorgenza della Malattia di Huntington. Tale mutazione si riflette nella produzione di una proteina dotata di un tratto poligluttammico (polyQ) più lungo di quello riscontrato nella proteina sana.

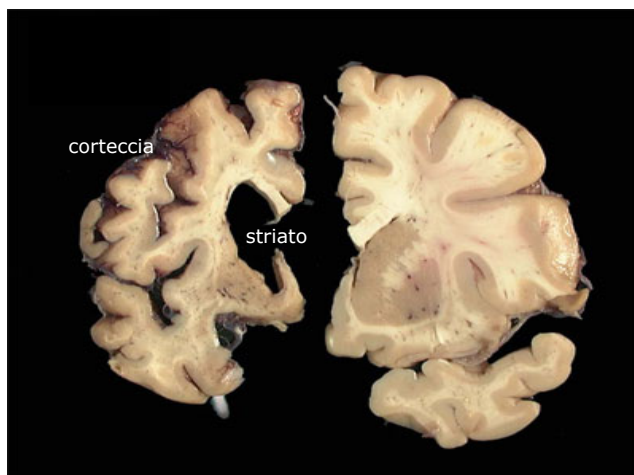


Figura 2: *Reperto autoptico da paziente HD (sinistra) e soggetto controllo (destra).*

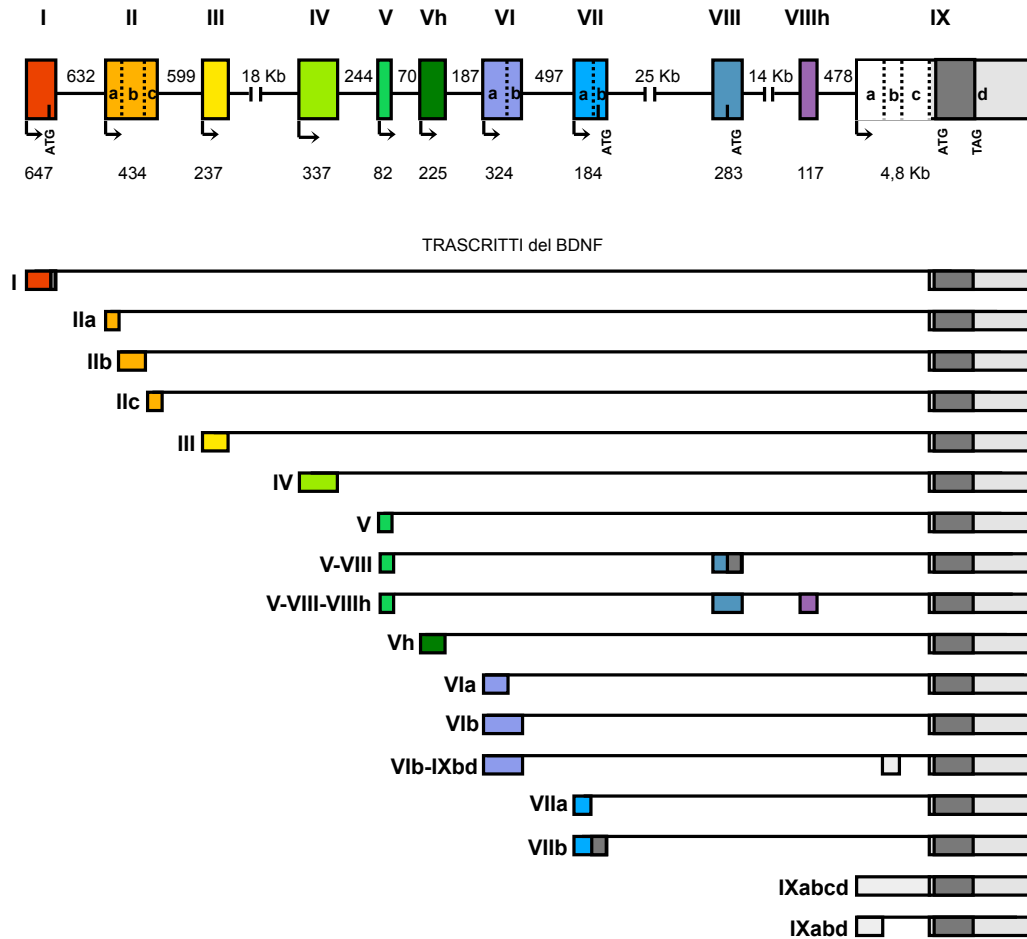


Figura 3: Struttura e trascritti alternativi del gene del BDNF umano.

Il gene del BDNF umano è costituito da 11 esoni di cui uno solo codificante il prodotto proteico (IX) e 9 promotori funzionali attivi a monte degli esoni non codificanti. I promotori sono attivi in tessuti periferici e nel sistema nervoso centrale. Gli esoni sono presentati mediante dei rettangoli, gli introni con delle linee. I numeri sotto gli esoni e sopra gli introni indicano le loro dimensioni, espresse in paia di basi (bp) se non indicato diversamente. Le frecce indicano i siti di inizio trascrizione. ATG e TAG indicano rispettivamente i codoni d' inizio e di fine traduzione. Le linee verticali tratteggiate indicano i siti di *splicing* alternativo per i vari esoni.

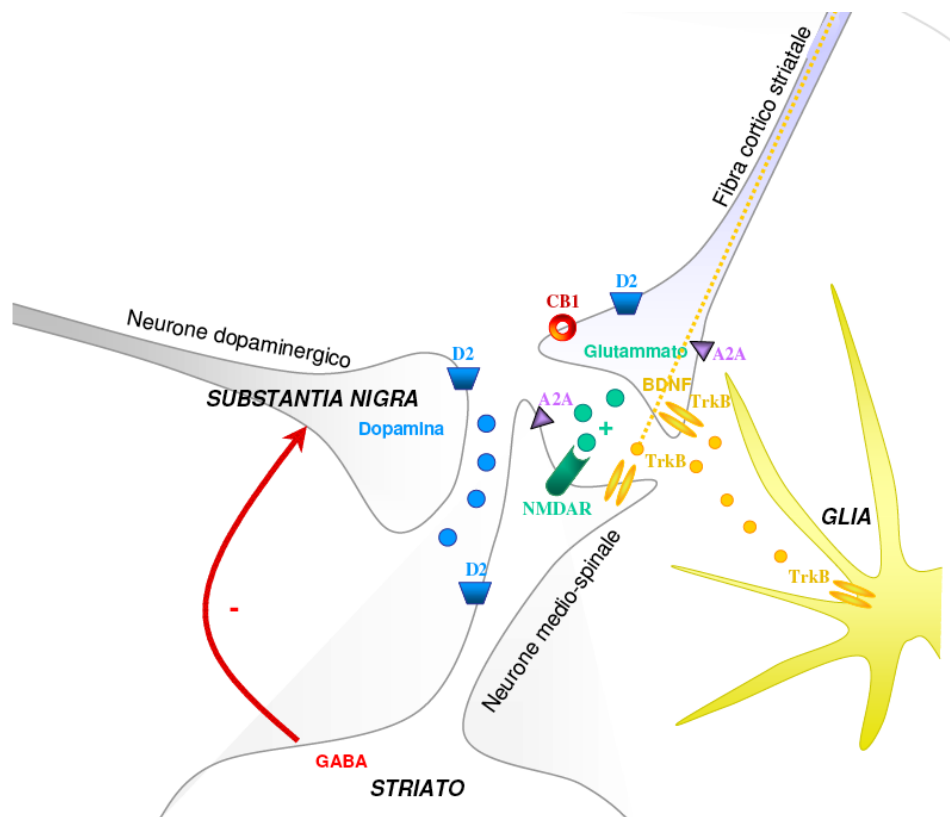


Figura 4. *Principali sistemi neurotrasmettitoriali della via cortico-striatale.* Il glutammato (verde), è il principale neurotrasmettitore eccitatorio della via cortico-striatale. L'attività della sinapsi cortico-striatale e il rilascio di glutammato sono regolati da adenosina, endocannabinoidi, dopamina e BDNF. L'adenosina legandosi al recettore A2A pre-sinaptico (viola) stimola il rilascio di glutammato dalle fibre cortico-striatali. Gli endocannabinoidi interagendo coi recettori CB1 pre- sinaptici (rossi), mediano l'inibizione della trasmissione glutammatergica. La dopamina, rilasciata dai neuroni aventi origine dalla *Substantia nigrapars compacta*, interagendo coi recettori D2 (azzurri) pre-sinaptici riduce il rilascio del glutammato. Il BDNF (arancione), prodotto in corteccia e veicolato mediante trasporto anterogrado allo striato, interagendo coi recettori TrkB pre-sinaptici promuove il rilascio di glutammato, mentre legando i recettori TrkB post-sinaptici inibisce la trasmissione GABAergica. Il BDNF interagisce anche con recettori TrkB tronchi presenti sulle cellule gliali, venendo così internalizzato e accumulato all'interno di esse.

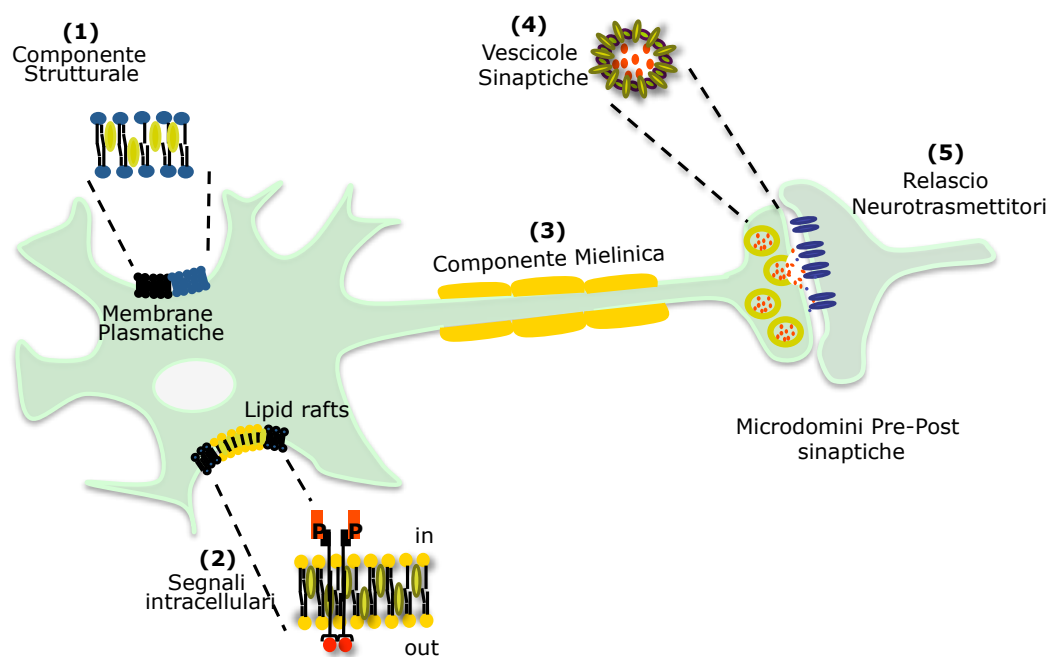


Figura 5: Rappresentazione schematica delle funzioni del colesterolo nel cervello

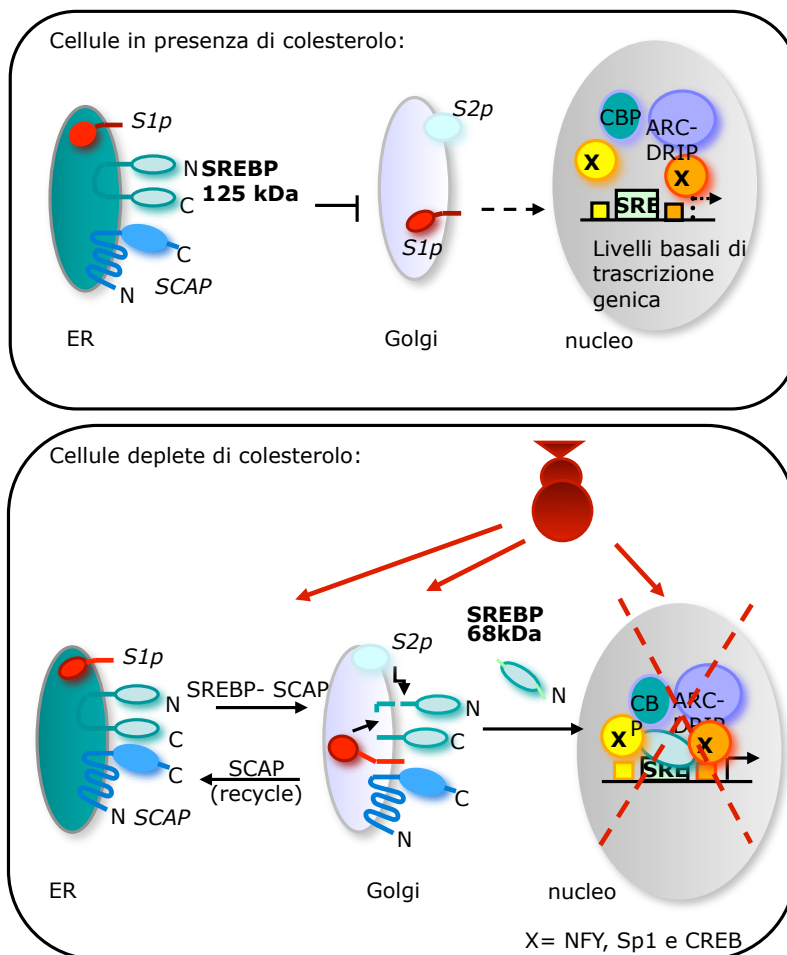
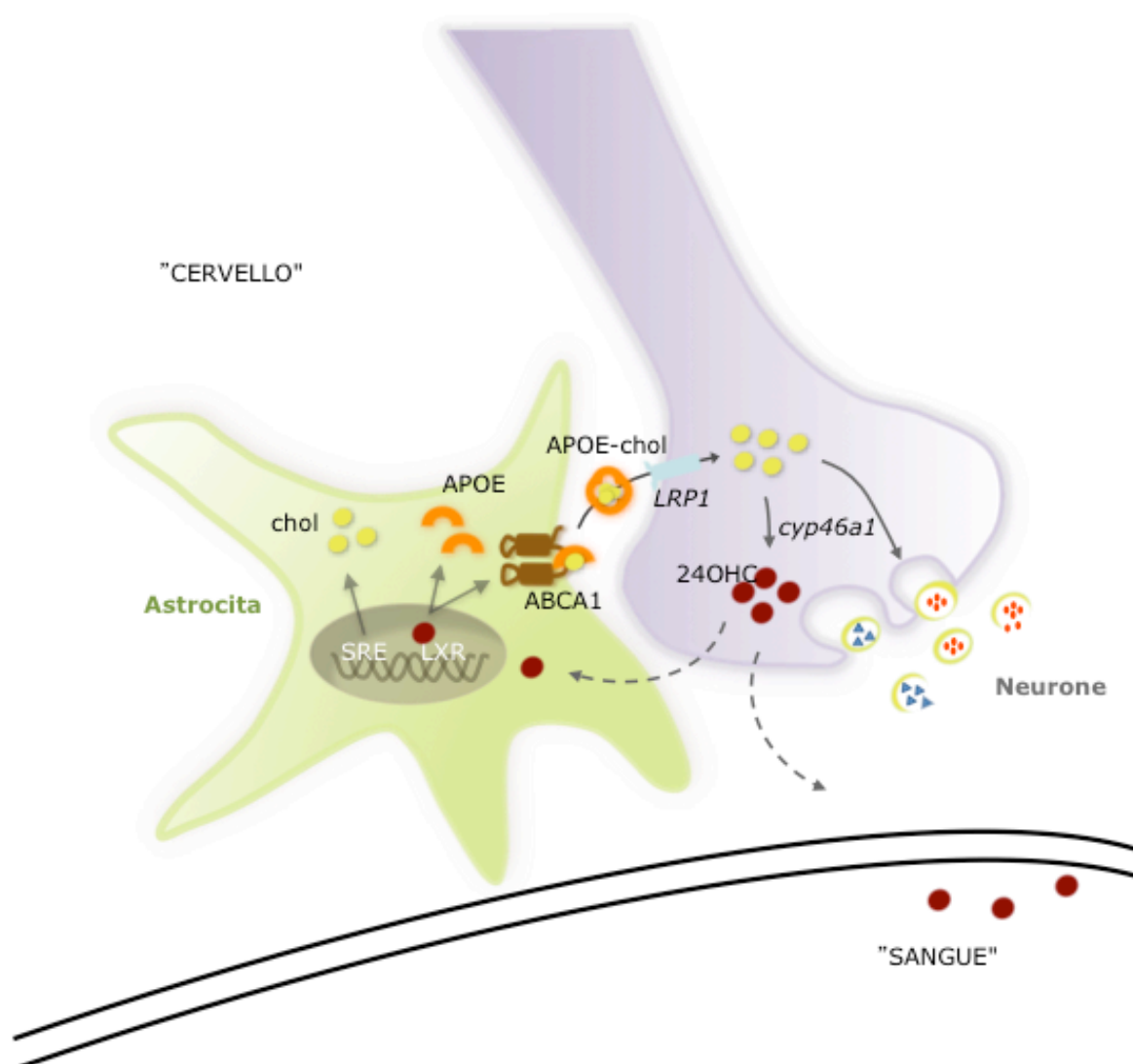


Figura 6: *Rappresentazione riassuntiva del meccanismo e della regolazione di SREBP.* I geni regolati da SREBP contengono nel loro promotore l'elemento SRE e sono coinvolti nella via di biosintesi del colesterolo, dei trigliceridi e dei fosfolipidi. In cellule ricche di colesterolo, il meccanismo SREBP è bloccato; senza colesterolo, il meccanismo viene attivato. L'huntingtina mutata probabilmente inibisce l'attivazione e la traslocazione nucleare di SREBP.

Figura 7: *Cross-talk astrociti neuroni:* Nella figura sottostante sono rappresentati le principali componenti cellulari coinvolti nella comunicazione tra i neuroni e gli astrociti per la neo-sintesi del colesterolo



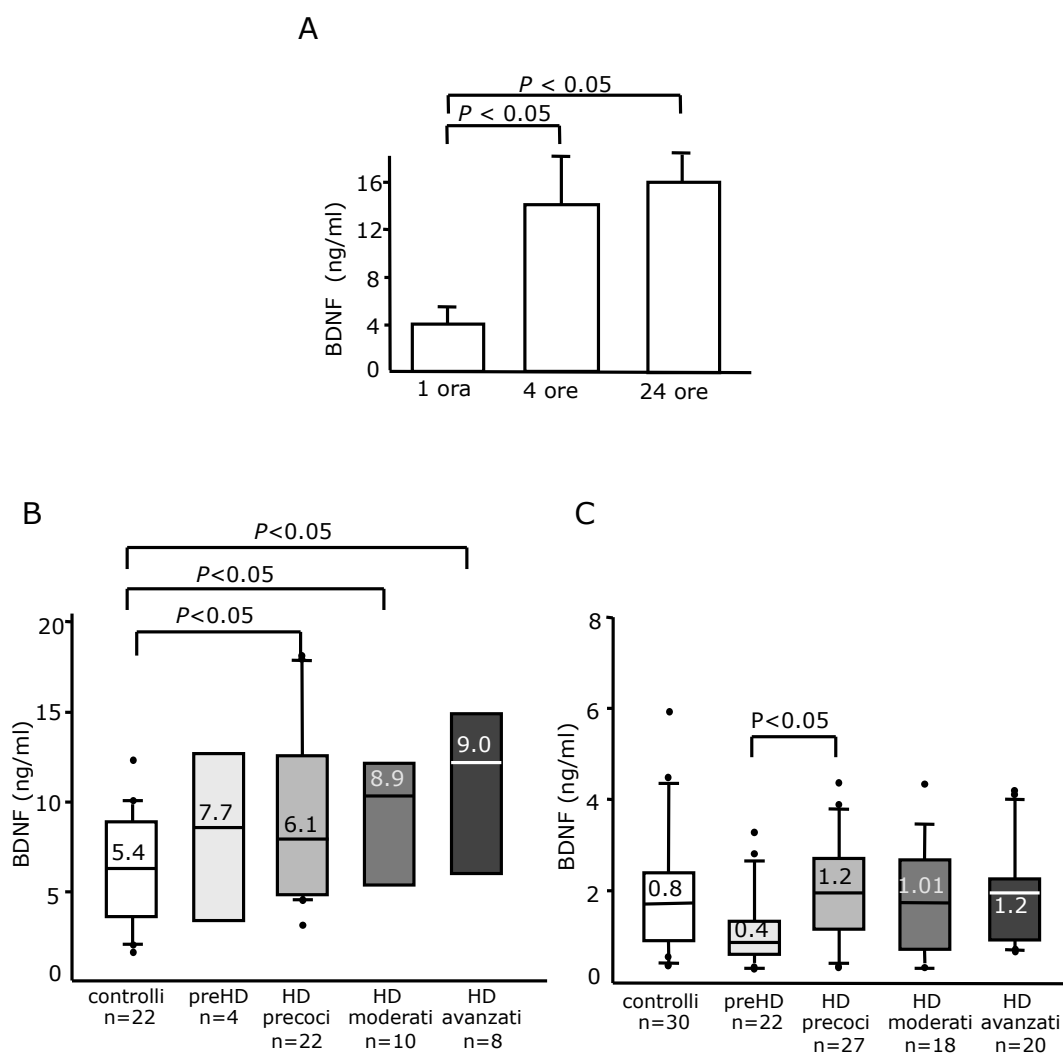


Figura 8: BDNF proteina nel plasma umano misurato tramite saggio ELISA. A) Contenuto di BDNF nel plasma di 3 soggetti controllo preparato dopo 1, 4 e 24 ore post prelievo ($p < 0.05$ tra i campioni di plasma preparati dopo 4 e 24 ore rispetto ad 1 ora, unpaired t-test). B) Livelli di BDNF proteina nel plasma dei campioni del gruppo francese preparati dopo 4 ore dal prelievo. I livelli di BDNF nei campioni sono molto variabile, il valore indicato nel box è il valore mediano ($p < 0.05$, controlli contro i pazienti HD precoci, $p < 0.05$ controlli vs contro I pazienti HD moderati e $p < 0.05$ controlli vs HD avanzati, in accordo Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test C) Contenuto di BDNF proteina nel plasma dei campioni del Gruppo A Inglese, preparato dopo 2 ore dal prelievo. I livelli di BDNF proteina nei soggetti preHD sono significativamente ridotti rispetto ai livelli di BDNF proteina in pazienti HD in stadi precoci, $P < 0.05$ in accordo a Kruskal-Wallis test con il Dunn's multiple comparison test.

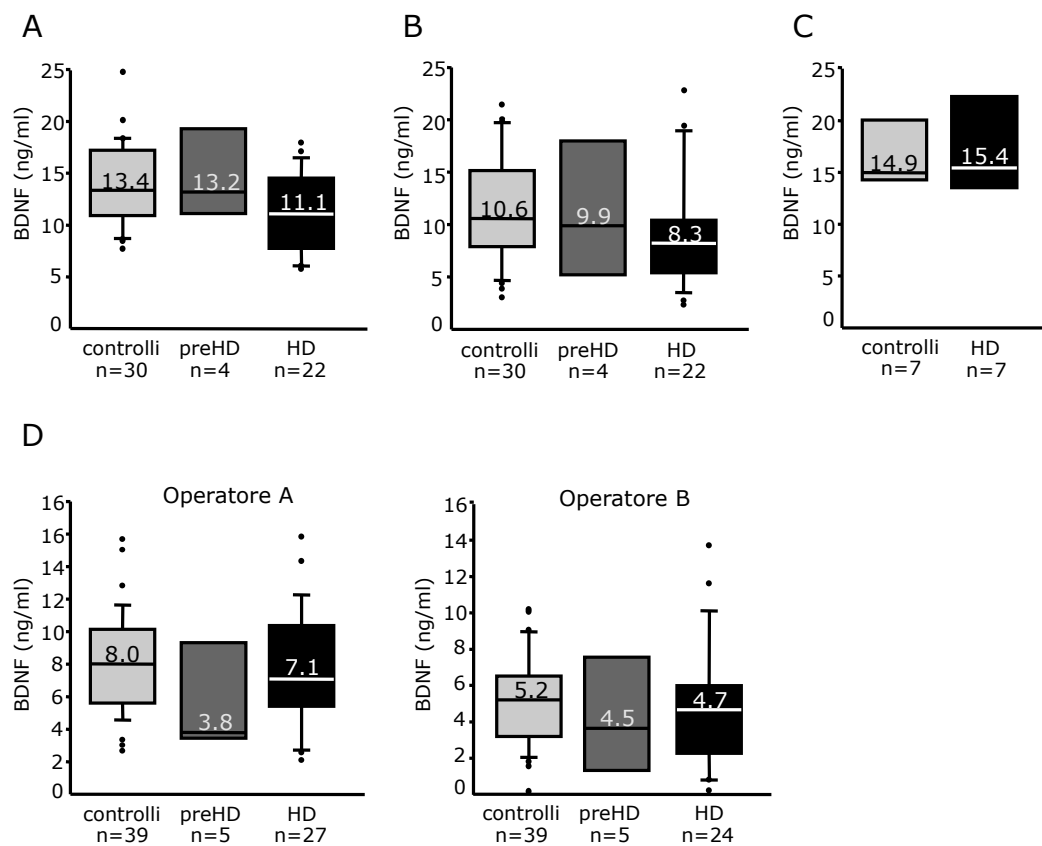


Figura 9. Analisi dei livelli di BDNF proteina nel siero umano. A) Livelli di BDNF nel siero di soggetti controllo e preHD e di pazienti HD nel gruppo Italiano A . B) Misure del BDNF nel siero dei campioni analizzate in A dopo una settimana. C) Analisi del contenuto del BDNF nel siero dei campioni controllori e pazienti HD nel gruppo Italiano B. D) Livelli di BDNF nel siero dei campioni analizzati in A, B, e C dopo 3 mesi; l' esperimento è stata effettuato in parallelo da due operatori sulle stesse aliquote di siero con gli stessi reagenti.

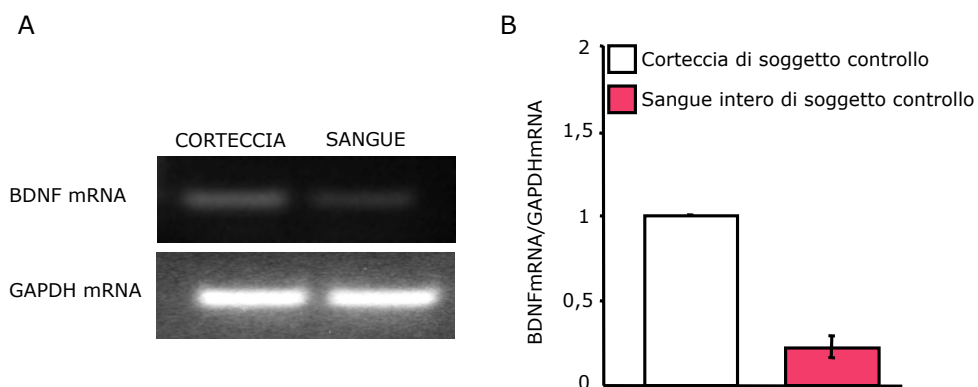


Figura 10. Livelli di RNA messaggero del BDNF in corteccia cerebrale e in sangue periferico intero di soggetti controllo. A) PCR qualitativa; B) PCR quantitativa *Real-time* rappresentativa di tre replicati sperimentali. Il contenuto di RNA messaggero del BDNF è stato normalizzato sui livelli totali di RNA messaggero del GAPDH.

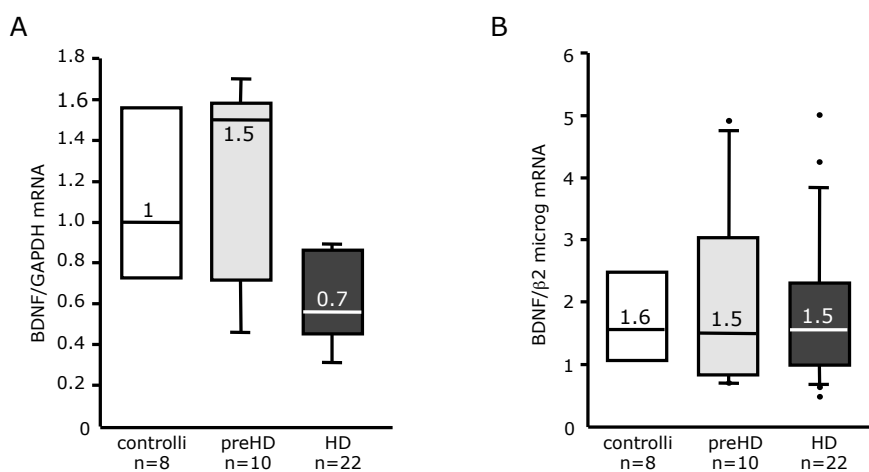


Figura 11: Livelli di RNA messaggero del BDNF in sangue periferico intero di soggetti controllo e HD. Campioni dal Gruppo Inglese B. Il contenuto di RNA messaggero del BDNF è normalizzato: A) sui livelli di RNA messaggero del GAPDH B) sui livelli di RNA messaggero della $\beta 2$ -microglobulina. La linea entro il box rappresenta la mediana, quella più vicina allo zero indica il 25°percentile, mentre la linea più lontana dallo zero indica il 75°percentile. I punti rappresentano i campioni al di sotto del 10°percentile e al di sopra del 90°percentile. $p < 0,05$, Mann-Whitney U-test.

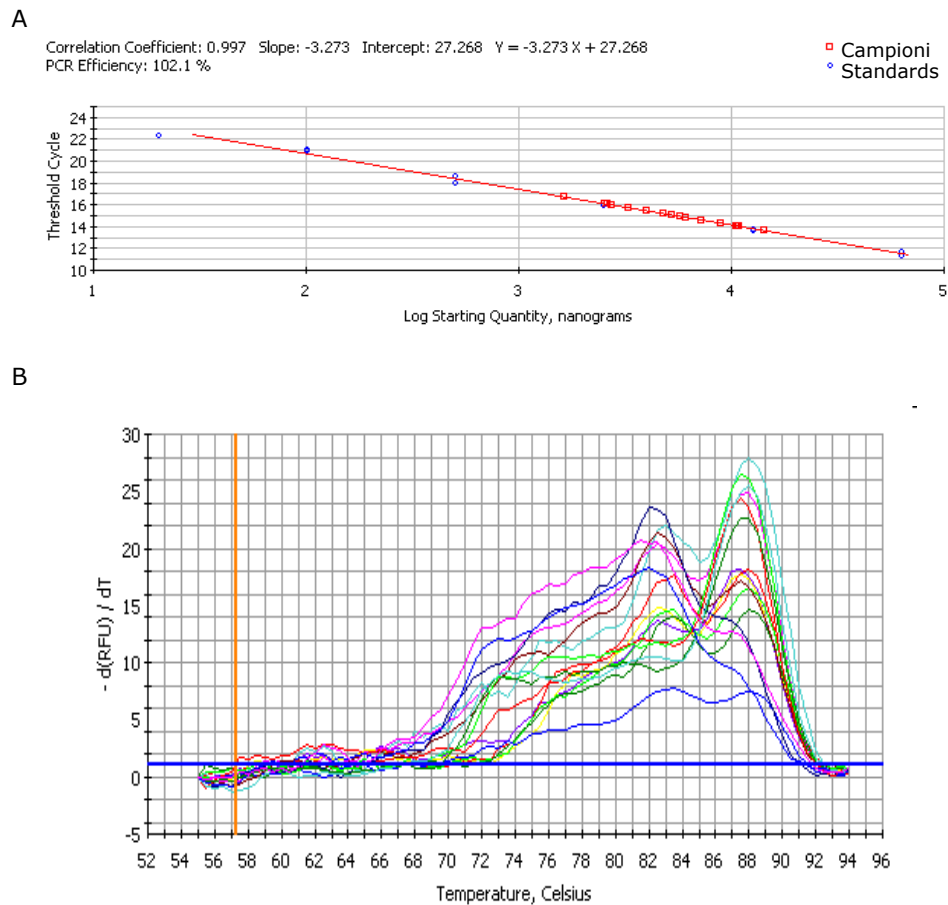


Figura 12. Amplificazione mediante PCR qualitativa Real-time delle sequenze EAR. A) Curva standard. I cicli di amplificazione del messaggero in campioni sottoposti a diluizioni seriali sono messi in relazione con il logaritmo della quantità totale del cDNA utilizzato nella reazione. B) Curve di *melting* dei prodotti di amplificazione: l'elevato numero di sequenze EAR presenti nel genoma umano e la presenza di polimorfismi al loro interno determina la produzione di curve di *melting* caratterizzate da temperature diverse e dalla presenza di molteplici picchi. Sull'asse delle Y è riportata la variazione della fluorescenza relativa nell'unità di tempo, indice della quantità di prodotto di amplificazione a doppio filamento, mentre sull'asse delle X la temperatura di *melting*.

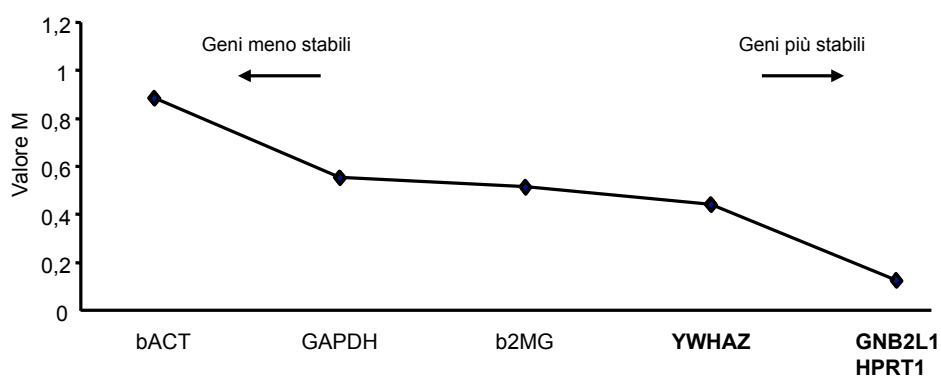


Figura 13: *Idividuazione dei "reference gene" più stabili nel sangue periferico intero:* Applicazione dell'algoritmo Genorm. Il valore M, espressione della stabilità media dei singoli geni, è calcolato ricorrendo all'analisi di 8 campioni di sangue prelevati da soggetti controllo appartenenti al Gruppo Italiano C. In **Bold** sono indicati i "reference genes" la cui espressione è più stabile nel sangue periferico intero.

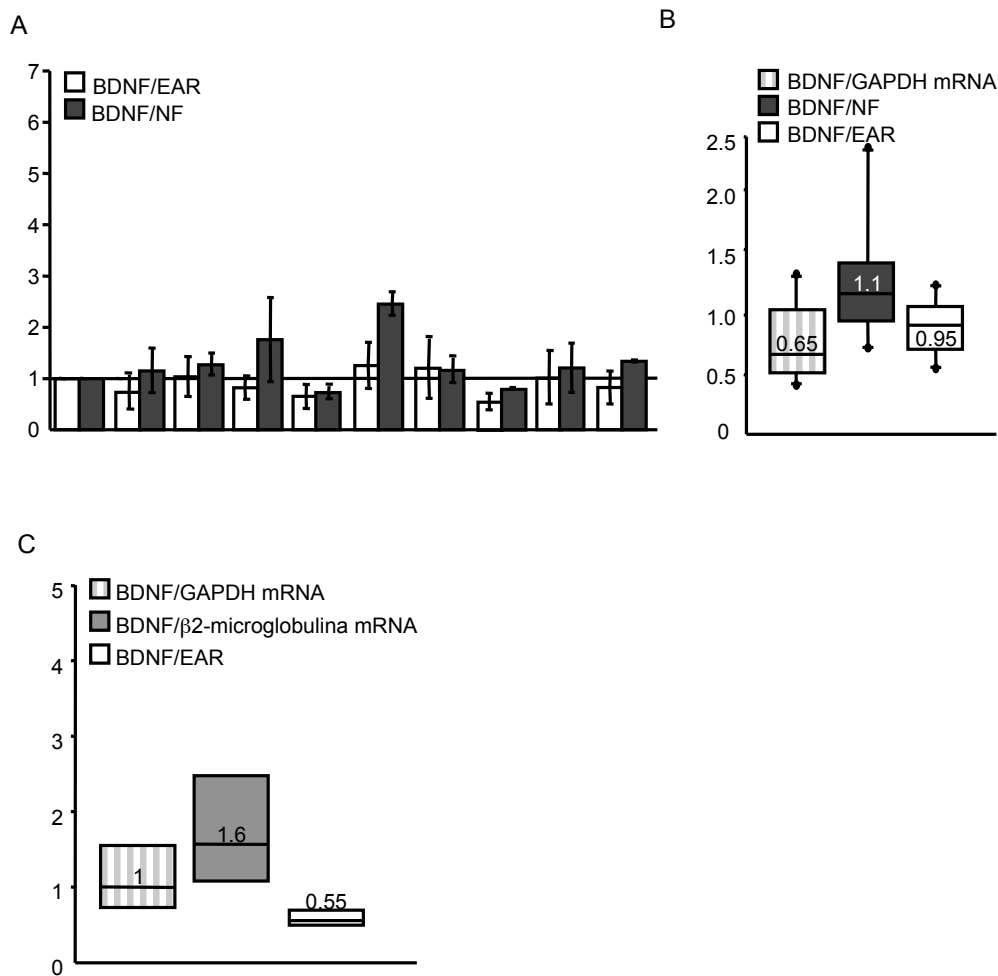


Figura 14: Validazione delle ripetizioni EAR come nuovo strumento di normalizzazione in Real Time PCR. A) Livelli di BDNF mRNA in sangue di 10 soggetti controllo normalizzati verso le sequenze EAR e verso le NF ottenuto dalla media geometrica dei livelli di espressione dei 3 piú stabili geni controllo. B) Valori di mediana dei livelli di BDNF mRNA normalizzati verso GAPDH, NF e ripetizioni EAR. (A-B) Analisi effettuate su soggetti sani appartenenti al Gruppo Italiano C. C) Valori di mediana del messaggero del BDNF quantizzato su GAPDH, β 2-microglobulina ed EAR in 8 soggetti controllo reclutati dal Gruppo Inglese B. La linea entro il box rappresenta la mediana, quella piú vicina allo zero indica il 25°percentile, mentre la linea piú lontana dallo zero indica il 75°percentile. I punti rappresentano i campioni al di sotto del 10°percentile e al di sopra del 90°percentile.

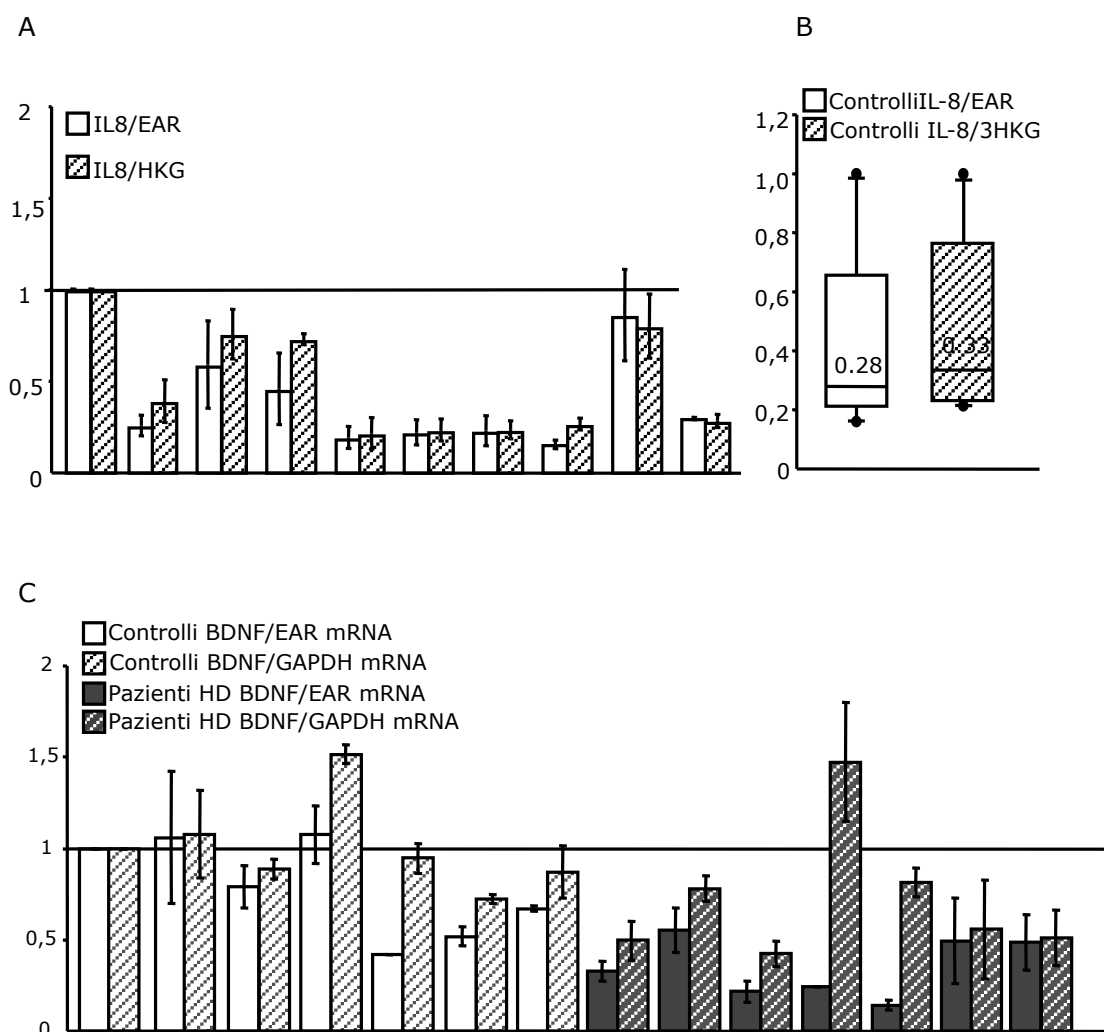


Figura 15: Applicazione del metodo di normalizzazione con il messaggero delle sequenze EAR in altri tessuti umani. A) Livelli di RNA messaggero dell'interleuchina 8 (IL8), RNA messaggero espresso in modo specifico nel sangue, normalizzati sul messaggero delle sequenze EAR (colonne bianche) e dei tre "reference genes" più stabili nel sangue. B) Valori mediani dei livelli di IL8 normalizzati sulle sequenze EAR e sui 3 "reference genes" più stabili. Analisi effettuate su 10 soggetti sani appartenenti al Gruppo Italiano C. C) Livelli di BDNF messaggero nella corteccia cerebrale di 7 soggetti controllo e 7 pazienti Huntington normalizzati sul messaggero delle sequenze EAR e sul messaggero del GAPDH. La linea entro il box rappresenta la mediana, quella più vicina allo zero indica il 25°percentile, mentre la linea più lontana dallo zero indica il 75°percentile. I punti rappresentano i campioni al di sotto del 10°percentile e al di sopra del 90°percentile.

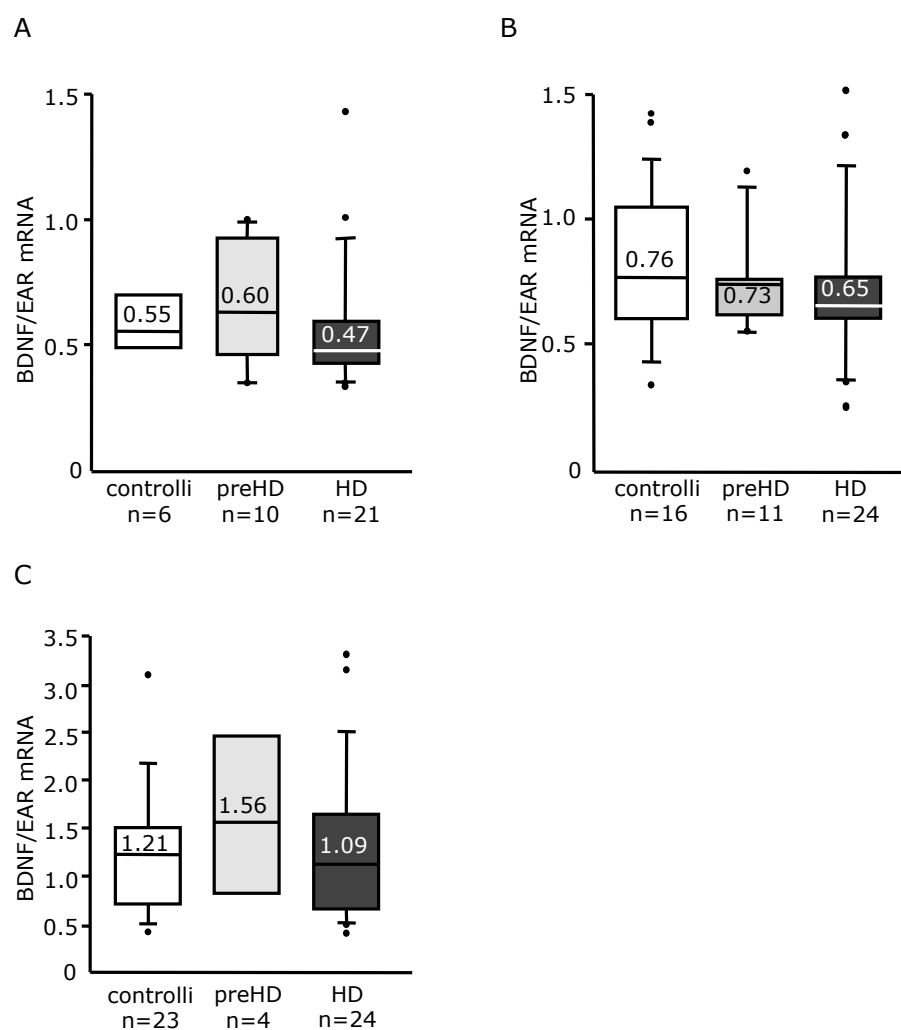


Figura 16: Analisi dei livelli di RNA messaggero del BDNF in sangue periferico di soggetti controllo, pre-sintomatici e pazienti Huntington. I livelli di RNA messaggero del BDNF sono normalizzati sul messaggero delle sequenze EAR. Nei pannelli A) e B) sono riportati i livelli di messaggero del BDNF rilevati in campioni di sangue del Gruppo Inglese B e C. C) Analisi dei campioni del Gruppo Italiano C. La linea entro il box rappresenta la mediana, quella più vicina allo zero indica il 25°percentile, mentre la linea più lontana dallo zero indica il 75°percentile. I punti rappresentano i campioni al di sotto del 10°percentile e al di sopra del 90°percentile. Il test di Mann-Whitney ha evidenziato la mancanza di una differenza significativa nei livelli di BDNF messaggero nel sangue di soggetti controllo e di pazienti Huntington ($p > 0,05$).

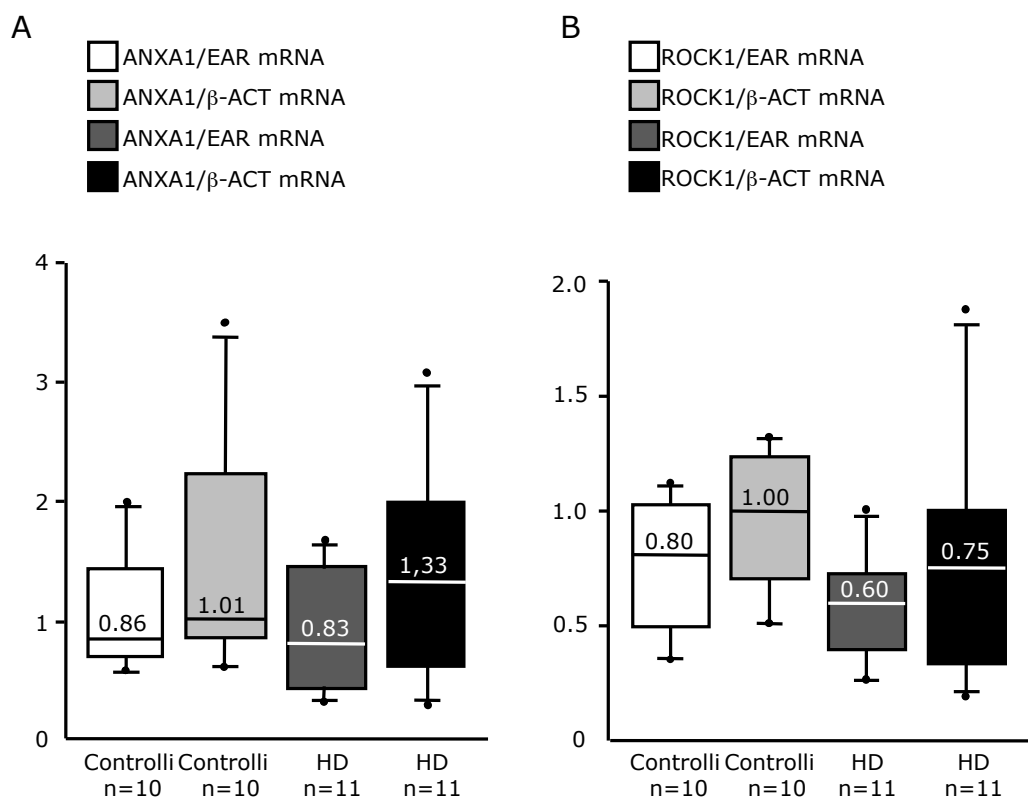


Figura 17: Livelli del messaggero di ANXA1, ROCK1 e IER3 in soggetti controllo e pazienti Huntington. A) Livelli dell'RNA messaggero di ANXA1 normalizzati sul messaggero delle EAR e sul messaggero della bACTINA. B) Livelli dell'RNA messaggero di ROCK1 normalizzati sul messaggero delle EAR e della b-ACTINA. La linea entro il box rappresenta la mediana, quella più vicina allo zero indica il 25°percentile, mentre la linea più lontana dallo zero indica il 75°percentile. I punti rappresentano i campioni al di sotto del 10°percentile e al di sopra del 90°percentile. $p > 0,05$, test di Mann-Whitney, soggetto controllo verso pazienti Huntington.

Figure 1: Primary astrocytes from WT and R6/2 mice and astrocytes from NS knock-in cells show cholesterol defects

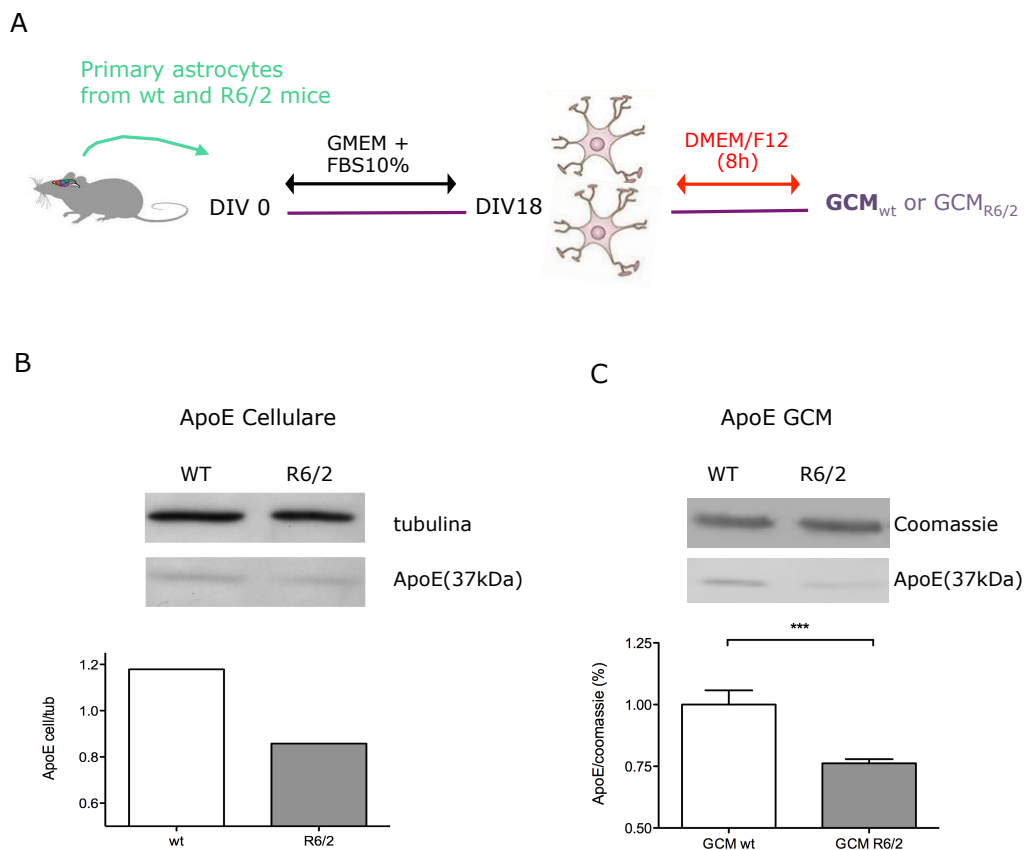


Figura 18: Caratterizzazione degli astrociti primari derivati da topi WT e R6/2. A) Schema rappresentativo della derivazione degli astrociti primari da topi P1. B) Livelli cellulari di lipoproteina ApoE negli astrociti primari da topi WT e R6/2 dopo 18 giorni di derivazione. C) WB per ApoE sul mediun condizionato dagli astrociti primari WT e R6/2 dopo 8H di incubazione con DMEM-F12 mediun. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

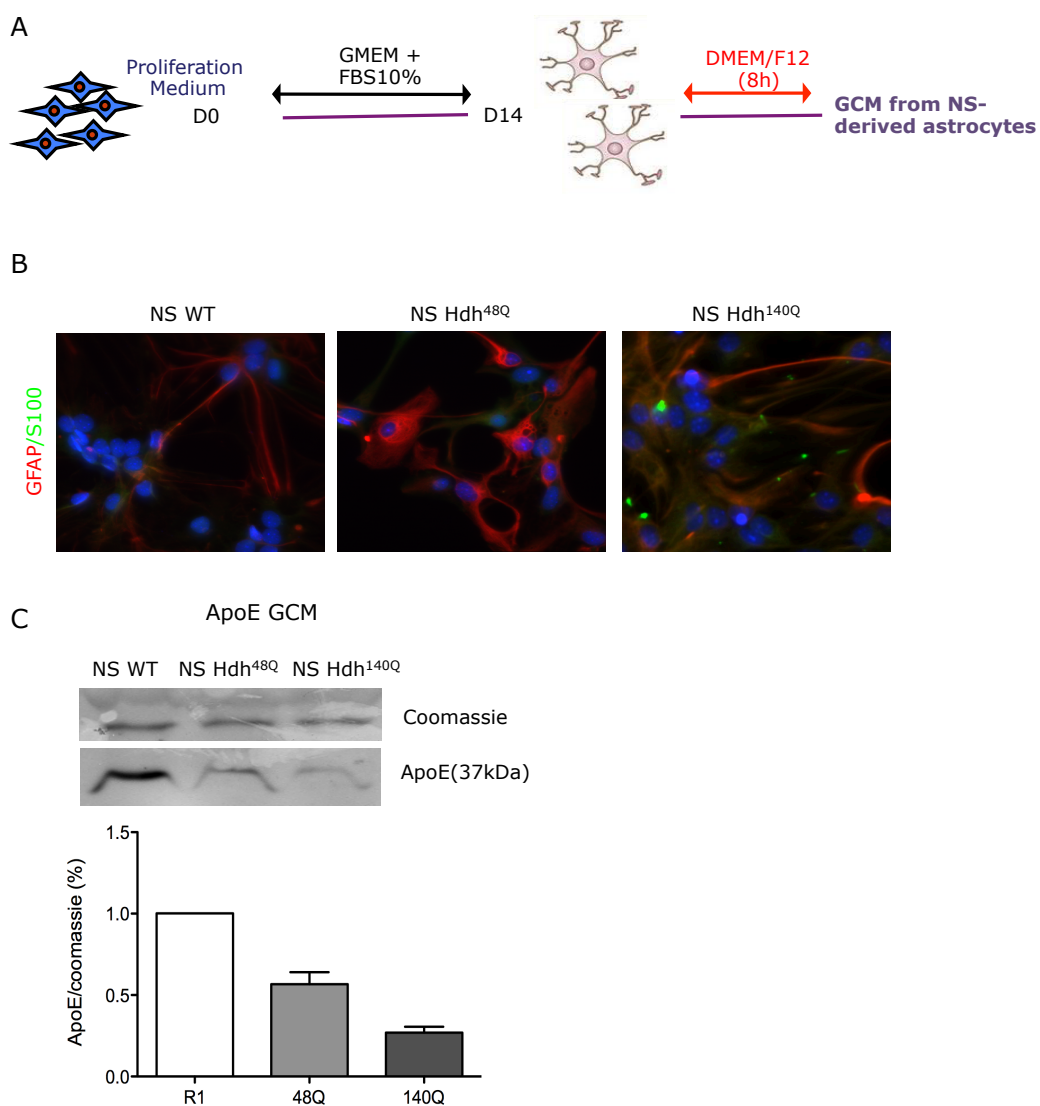


Figura 19: Caratterizzazione degli astrociti derivati da cellule NS WT e HD (Hdh^{48Q} e Hdh^{140Q}). A) Schema rappresentativo del differenziamento delle cellule NS ad astrociti. B) IC per i marcatori astrocitari GFAP (rosso) e S100 β (verde) su astrociti da cellule NS dopo 14 giorni di differenziamento. C) WB per ApoE sul mediun condizionato dagli astrociti derivati dalle cellule NS WT e HD dopo 8h di incubazione con DMEM-F12 mediun. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

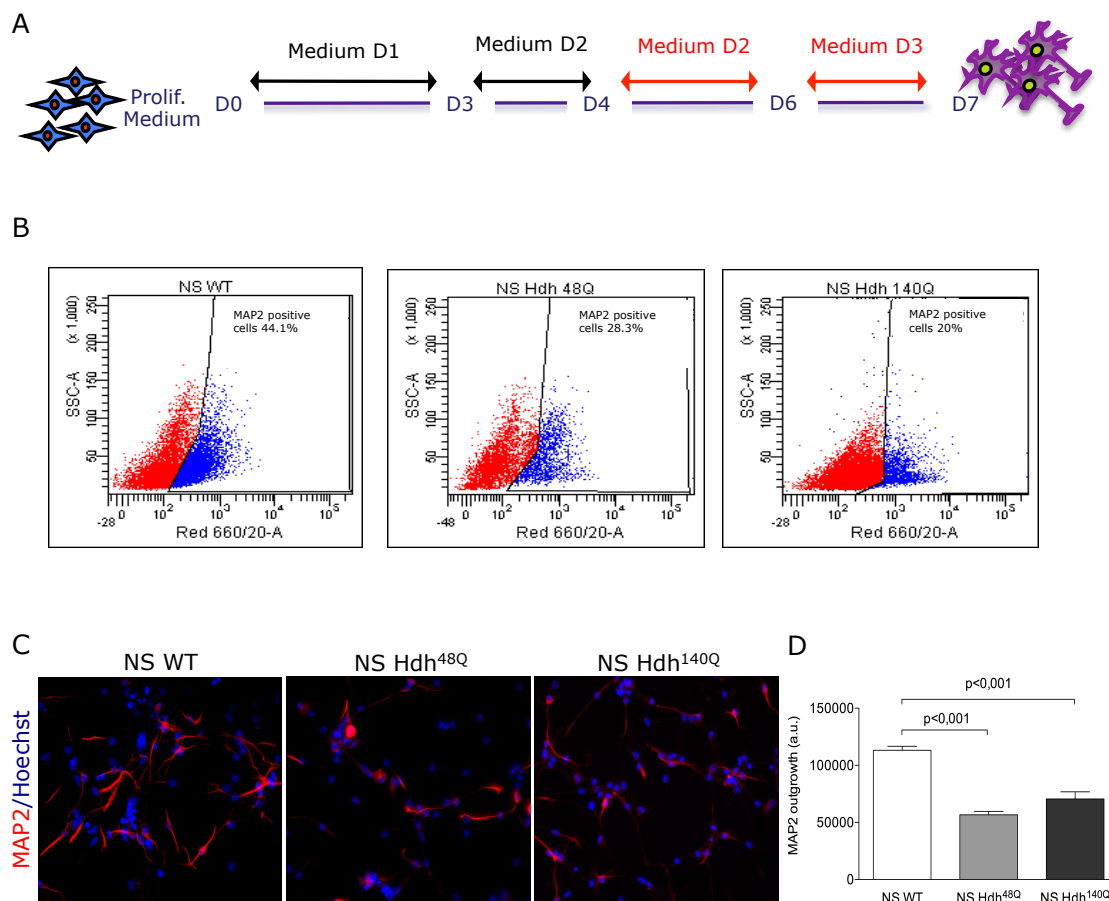


Figura 20: Livelli di MAP2 e crescita neuritica in neuroni derivati da NS WT e HD (*Hdh^{48Q}* e *Hdh^{140Q}*). A) Schema rappresentativo del differenziamento delle cellule NS a neuroni. B) Quantificazione delle cellule positive al marcatore MAP2 tramite FACS analisi nei neuroni NS dopo 7 giorni di differenziamento. C) IC per MAP2 (rosso) sui neuroni differenziati da cellule NS dopo 7 giorni di differenziamento. D) Quantificazione della crescita neuritica tramite Neurite Tracer nei neuroni derivati da cellule NS in condizioni basali di crescita. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

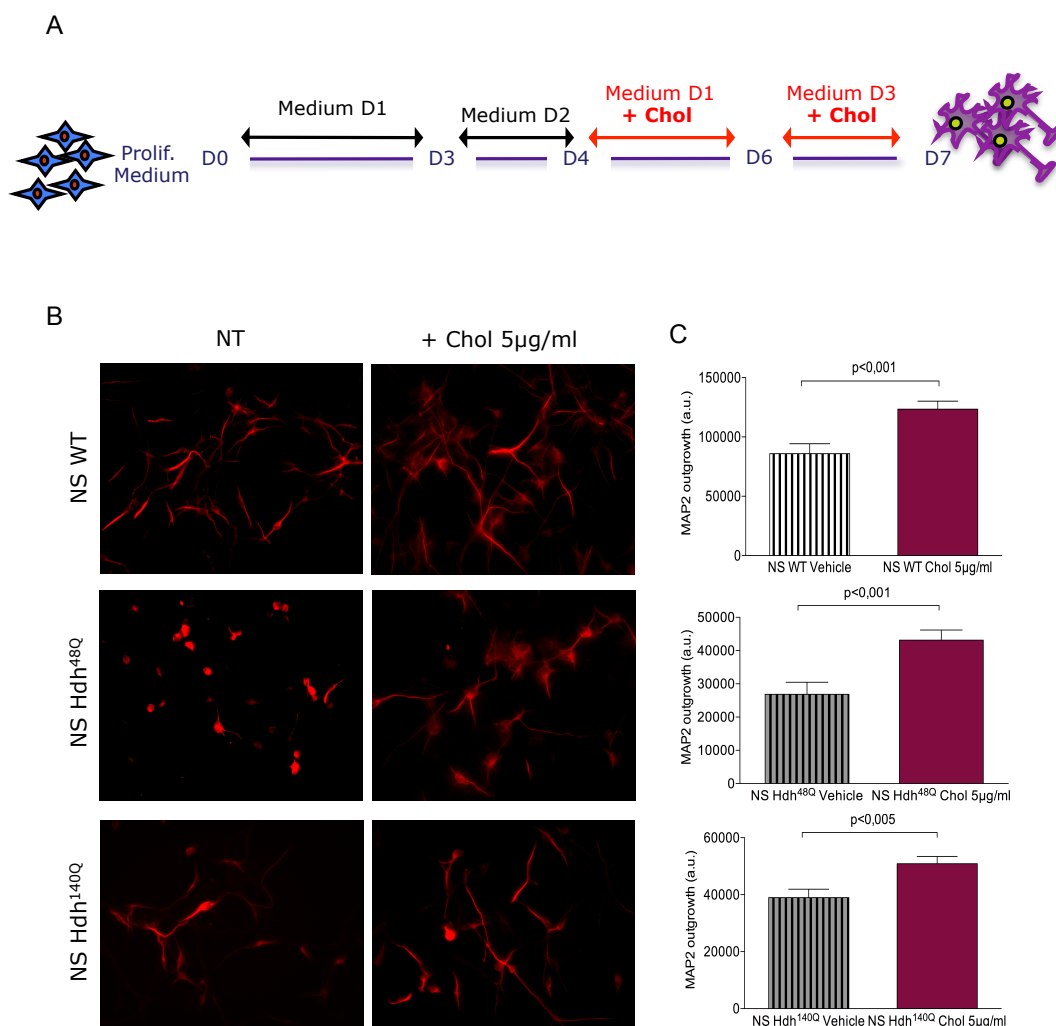


Figura 21: Crescita neuritica in neuroni derivati da NS WT e HD (*Hdh*^{48Q} e *Hdh*^{140Q}) dopo somministrazione di colesterolo. A) Schema rappresentativo del differenziamento delle cellule NS a neuroni. B) IC per MAP2 (rosso) sui neuroni differenziati da cellule NS dopo 7 giorni di differenziamento in condizioni di crescita normale e in presenza di colesterolo 5µg/ml. C) Quantificazione della crescita neuritica tramite Neurite Tracer nei neuroni derivati da cellule NS in condizioni basali di crescita ed in presenza di colesterolo. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

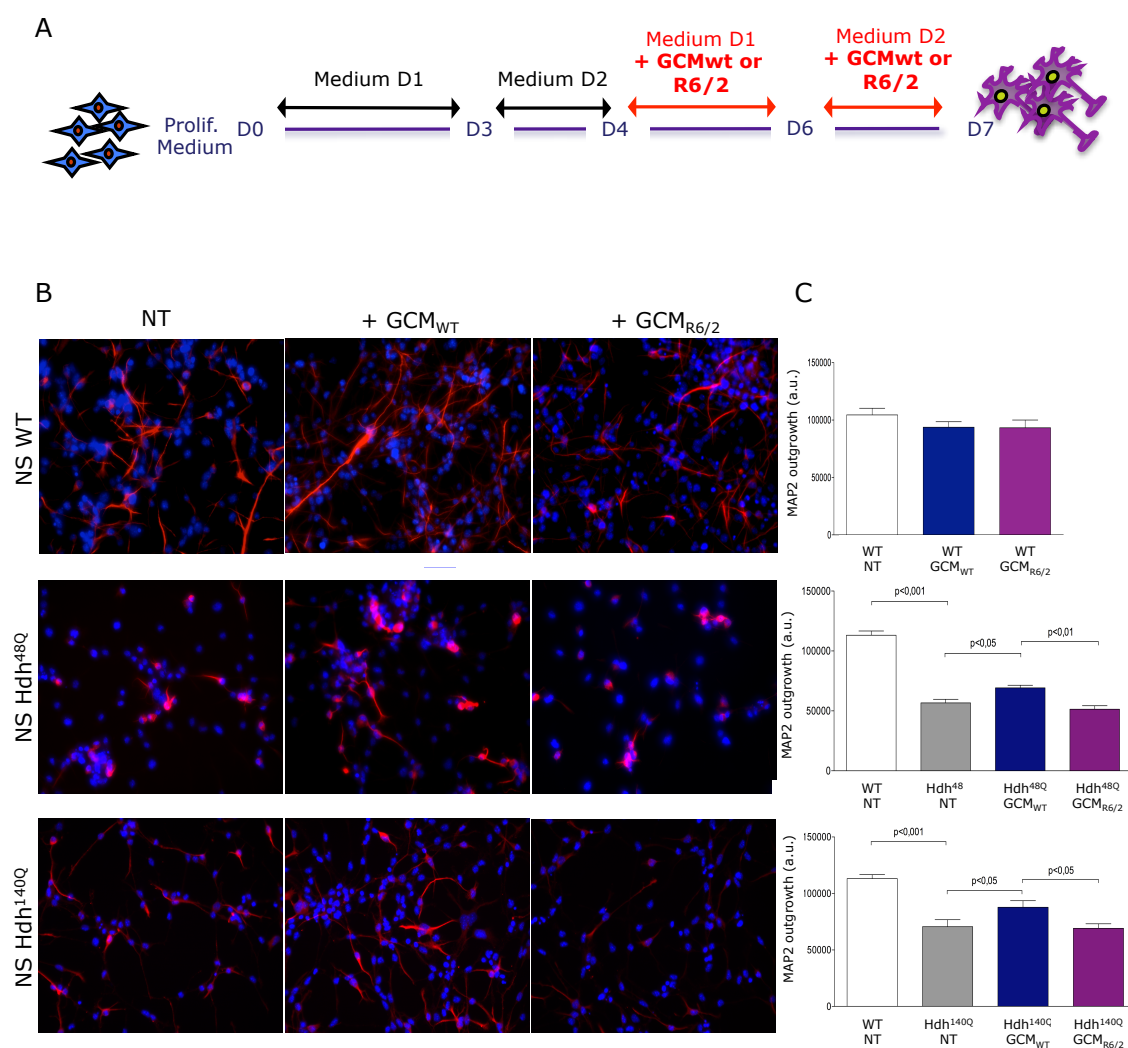


Figura 22: Crescita neuritica in neuroni derivati da NS WT e HD (Hdh^{48Q} e Hdh^{140Q}) dopo trattamento con GCM_{WT} e $GCM_{R6/2}$. A) Schema rappresentativo del differenziamento delle cellule NS a neuroni. B) IC per MAP2 (rosso) sui neuroni differenziati da cellule NS dopo 7 giorni di differenziamento in condizioni di crescita normale e in presenza di GCM_{WT} e $GCM_{R6/2}$. C) Quantificazione della crescita neuritica tramite Neurite Tracer nei neuroni derivati da cellule NS in condizioni basali di crescita ed in presenza dei GCM. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

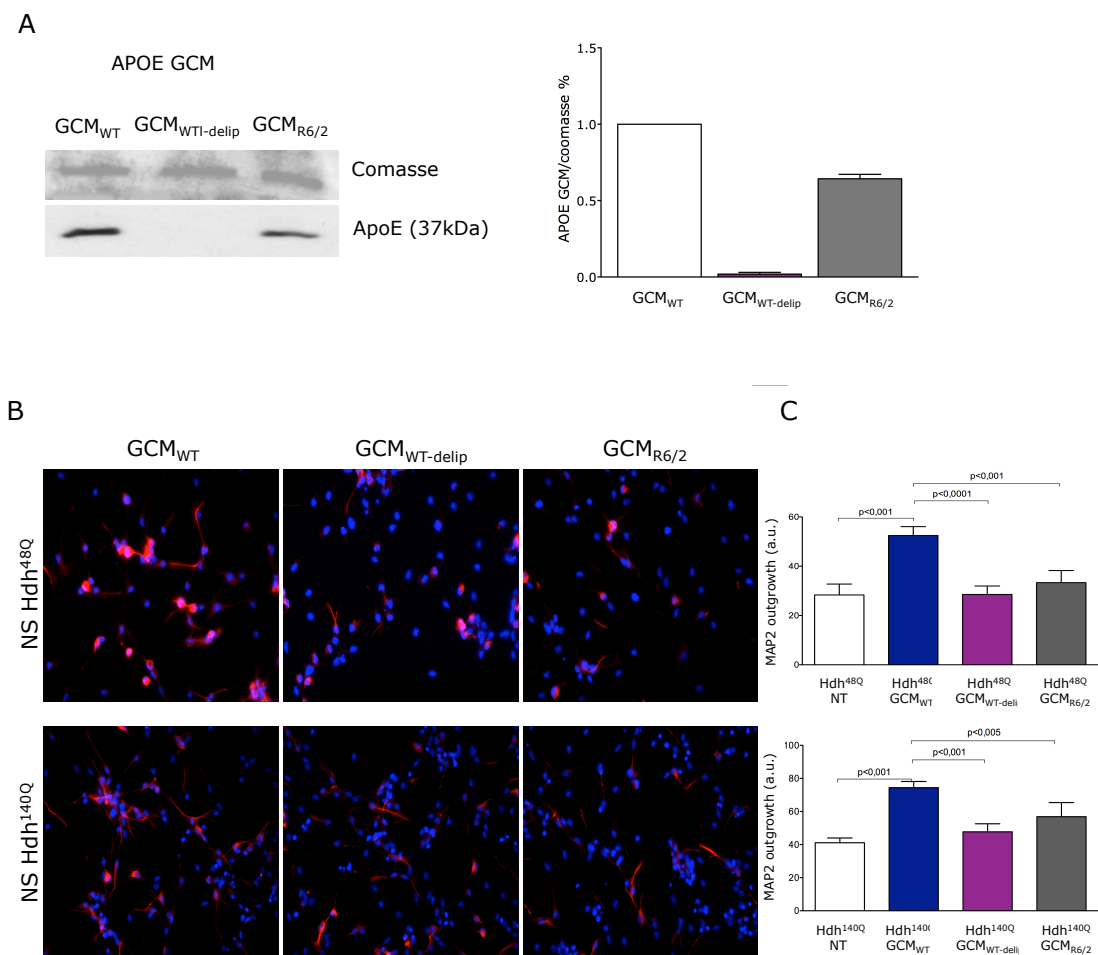


Figura 23: Crescita neuritica in neuroni derivati da NS WT e HD (Hdh^{48Q} e Hdh^{140Q}) dopo trattamento con GCM_{WT}, GCM_{WT-delip} e GCM_{R6/2}. A) WB per ApoE sul GCM_{WT}, GCM_{WT-delip} e GCM_{R6/2}. B) IC per MAP2 (rosso) sui neuroni differenziati da cellule NS dopo 7 giorni di differenziamento in presenza di GCM_{WT}, GCM_{WT-delip} e GCM_{R6/2}. C) Quantificazione della crescita neuritica tramite Neurite Tracer nei neuroni derivati da cellule NS con i diversi trattamenti. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

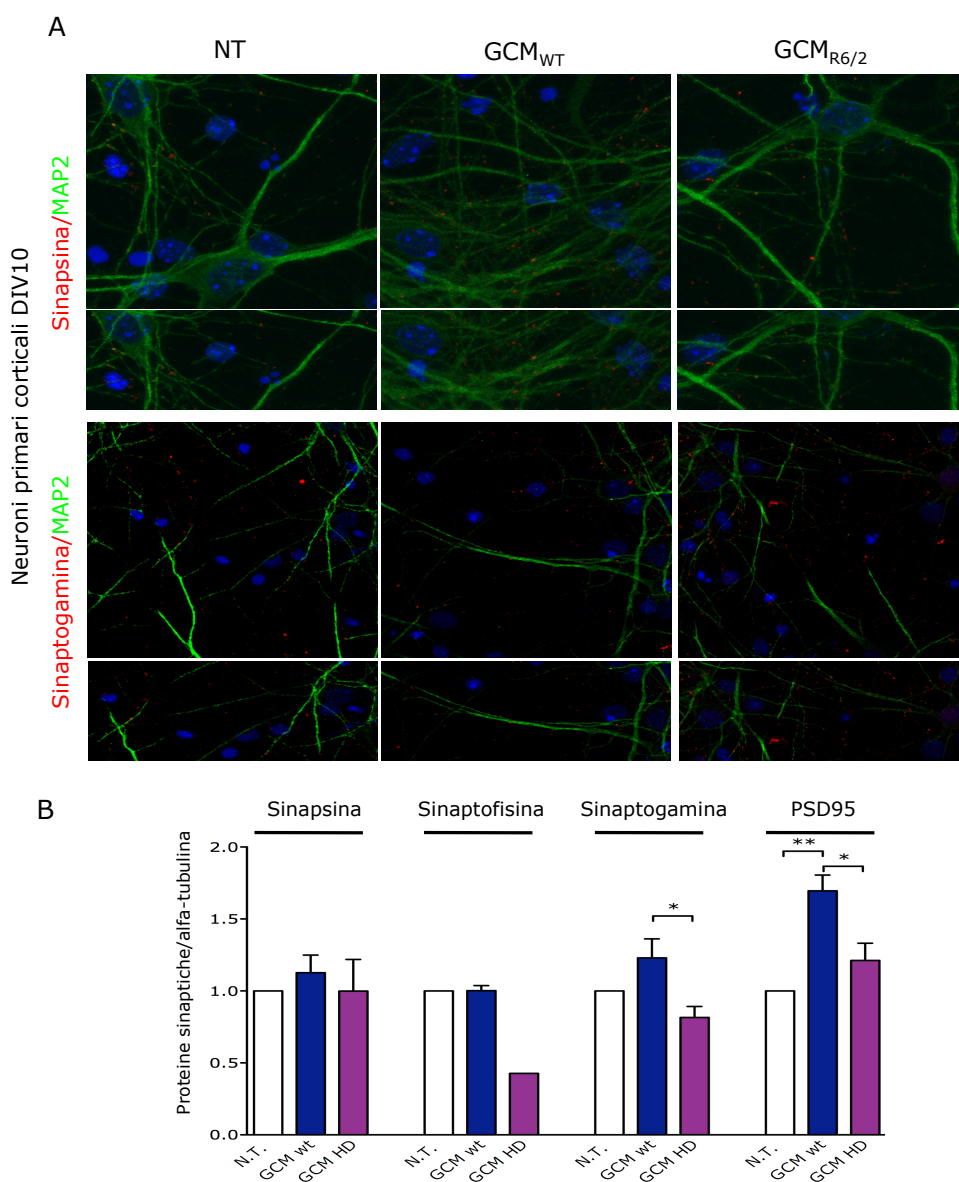


Figura 24: Attività sinaptica in neuroni corticali primari: A) IC per i marcatori sinaptici Sinapsina e Sinaptogamina su neuroni primari corticali dopo trattamento con GCM_{WT} e GCM_{R6/2}. B) WB per la quantificazione delle proteine sinaptiche in neuroni corticali primari derivati in condizioni normali di crescita ed in presenza di GCM_{WT} e GCM_{R6/2}. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

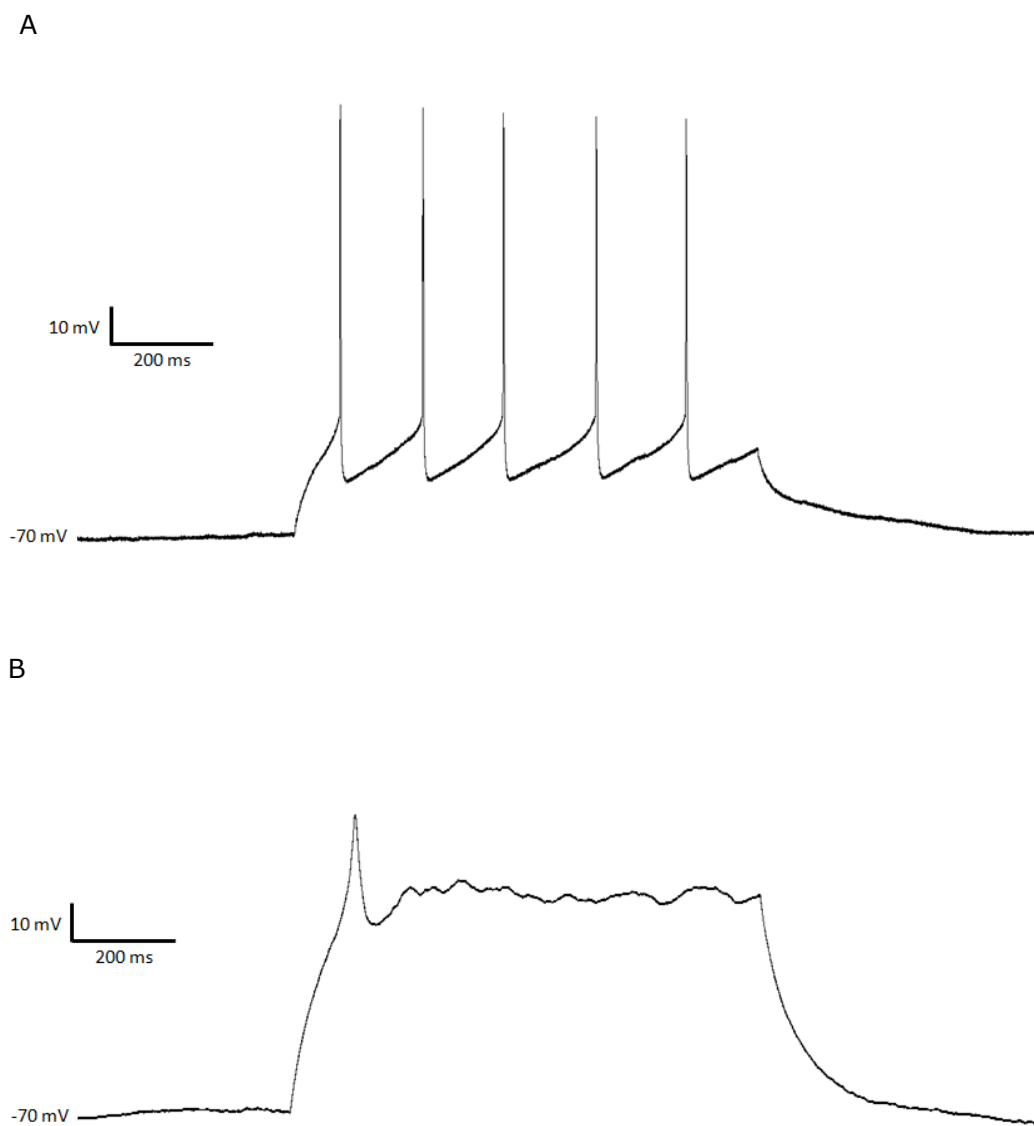


Figura 25: Potenziali d'azioni spontanei misurati in neuroni corticali primari derivati in presenza di GCM_{WT} (pannello A) e $GCM_{R6/2}$ (pannello B).

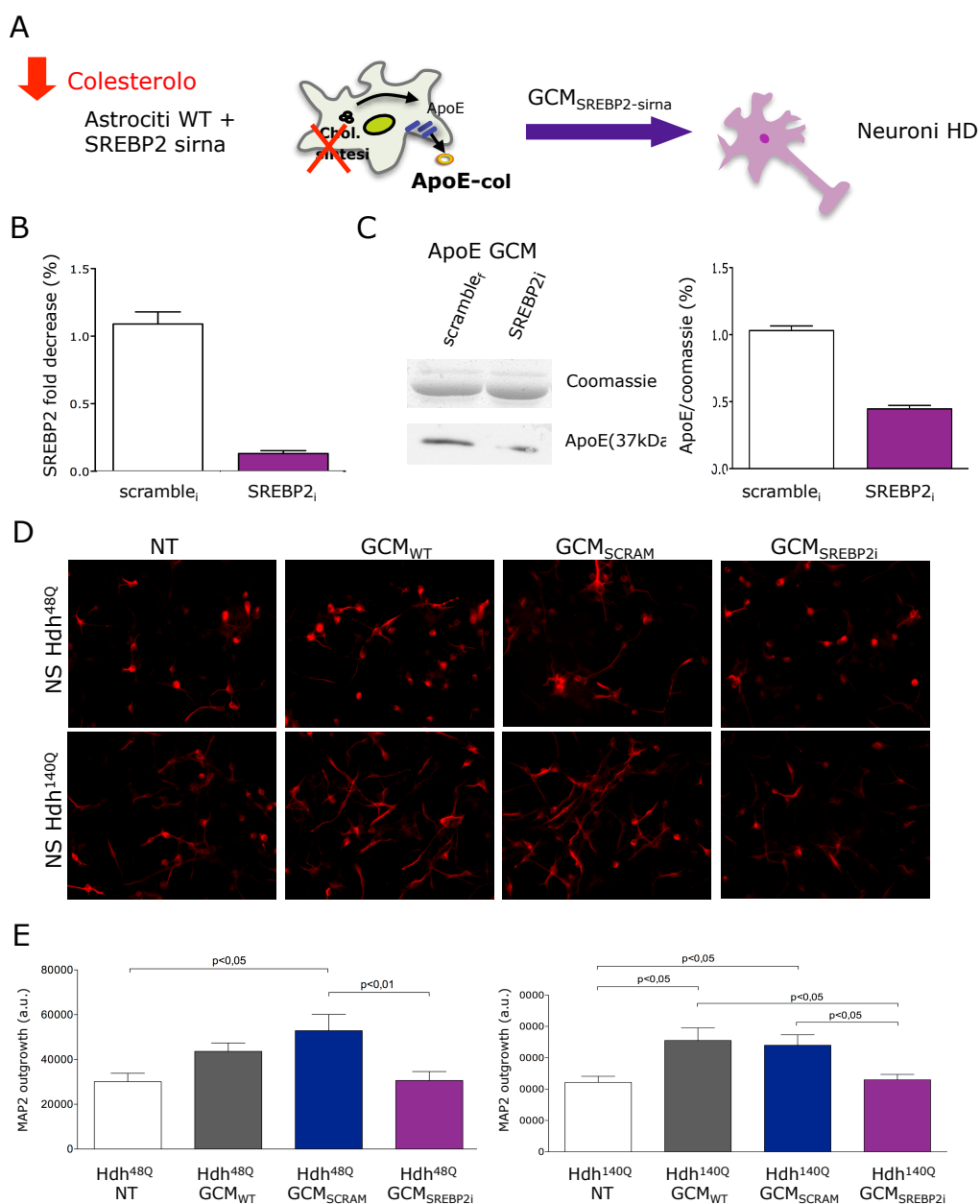


Figura 26: Quantificazione del MAP2 in neuroni derivati da NS e HD (*Hdh*^{48Q} e *Hdh*^{140Q}) in presenza di GCM da Astrociti WT nucleofettati con il siRNA di SREBP2 (BP2i). A) Schema rappresentativo del piano sperimentale. B) qPCR per SREBP2 in astrociti WT trattati con il siRNA specifico per BP2i. C) WB per ApoE sul medium condizionato dagli astrociti primari WT nucleofettati con il siRNA scramble e con il siRNA per SREBP2. D) IC per MAP2 (rosso) sui neuroni differenziati da cellule NS dopo 7 giorni di differenziamento in presenza di GCM_{WT}, GCM_{SCRAM} e GCM_{BP2i}. E) Quantificazione della crescita neuritica tramite Neurite Tracer nei neuroni derivati da cellule NS con i diversi trattamenti. Statistica: ANOVA test, Newman-Keuls multiple comparison test.

MANOSCRITTI ORIGINALI

Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients with Huntington's Disease

Chiara Zuccato¹, Manuela Marullo^{1,9}, Barbara Vitali^{1,9}, Alessia Tarditi^{1,9,□}, Caterina Mariotti², Marta Valenza¹, Nayana Lahiri³, Edward J. Wild³, Jenny Sassone⁴, Andrea Ciammola⁴, Anne Catherine Bachoud-Lèvi⁵, Sarah J. Tabrizi³, Stefano Di Donato², Elena Cattaneo^{1*}

1 Department of Pharmacological Sciences and Center for Stem Cell Research, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy, **2** Division of Biochemistry and Genetics, National Neurological Institute-IRCCS "Carlo Besta", Milan, Italy, **3** Department of Neurodegenerative Disease, UCL Institute of Neurology, University College London and National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, United Kingdom, **4** IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italy, **5** AP-HP, Centre National de référence maladie de Huntington, GHU Chenevier Mondor, Créteil, France

Abstract

Reduced Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels have been described in a number of patho-physiological conditions, most notably, in Huntington's disease (HD), a progressive neurodegenerative disorder. Since BDNF is also produced in blood, we have undertaken the measurement of its peripheral levels in the attempt to identify a possible link with HD prognosis and/or its progression. Here we evaluated BDNF level in 398 blood samples including 138 controls, 56 preHD, and 204 HD subjects. We found that BDNF protein levels were not reliably different between groups, whether measured in plasma (52 controls, 26 preHD, 105 HD) or serum (39 controls, 5 preHD, 29 HD). Our experience, and a re-analysis of the literature highlighted that intra-group variability and methodological aspects affect this measurement, especially in serum. We also assessed BDNF mRNA levels in blood samples from 47 controls, 25 preHD, and 70 HD subjects, and found no differences among the groups. We concluded that levels of BDNF in human blood were not informative (mRNA levels or plasma protein level) nor reliable (serum protein levels) as HD biomarkers. We also wish to warn the scientific community in interpreting the significance of changes measured in BDNF protein levels in serum from patients suffering from different conditions.

Citation: Zuccato C, Marullo M, Vitali B, Tarditi A, Mariotti C, et al. (2011) Brain-Derived Neurotrophic Factor in Patients with Huntington's Disease. PLoS ONE 6(8): e22966. doi:10.1371/journal.pone.0022966

Editor: Xiao-Jiang Li, Emory University, United States of America

Received: May 24, 2011; **Accepted:** July 3, 2011; **Published:** August 12, 2011

Copyright: © 2011 Zuccato et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project was supported by the NeuroNE Sixth Framework Programme, European Union, LSHM-CT-2004-512039; the Stem-HD Sixth Framework Programme, European Union, LSHB-CT-2006-037349; and the CHDI Foundation (USA) to EC. Some of this work was undertaken at UCLH/UCL, which received a proportion of funding from the Department of Health's NIHR Biomedical Research Centres funding scheme. ACBL was supported by Gis - Maladies rares (A04159JS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: elena.cattaneo@unimi.it

✉ These authors contributed equally to this work.

□ Current address: Siena Biotech S.P.A., Siena, Italy

Introduction

Reductions in Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels have been implicated in various pathological conditions affecting different organs [1,2,3,4,5]. BDNF has been detected also in the blood [6,7,8]. Because of its accessibility, interest has been kindled in the assessment of BDNF protein in blood, with the primary goal of determining whether its levels correlate to a given pathology and/or its progression or response to drugs. A summary of the most critical papers reporting such measurement is presented in **Table S1** (BDNF measurements in human serum) **and S2** (BDNF measurement in human plasma). In particular, low brain BDNF levels have been described in various neurodegenerative disorders, most notably, Huntington's Disease (HD), a progressive neurodegenerative disorder caused by a CAG trinucleotide expansion in the gene that encodes huntingtin [9,10].

Reduced level of BDNF protein and mRNA have been found in HD cells, in brain tissues from HD mice and in human post-mortem material [10]. A similar reduction in BDNF mRNA level was found

in HD rodent blood [11]. Furthermore, treatment of HD mice with the MLK inhibitor CEP-1347 led to increase in total BDNF mRNA in the blood and brain [11,12]. Recently, some of the current authors (JS, AC) have reported that serum BDNF was significantly lower in patients with HD than in age-matched healthy subjects [13] and other authors reported significantly higher levels in patients treated with riluzole [14]. However, intra-group variability may be problematic, especially since BDNF protein level is sensitive to a variety of factors [15,16,17,18]. Here we have undertaken a study aimed at evaluating BDNF level in the peripheral blood of HD patients, in order to investigate its robustness as a biological predictor of HD prognosis and drug efficacy.

Materials and Methods

Study design

Subjects were recruited from the National Neurological Institute "Carlo Besta", Milan (Italy), the National Hospital for Neurology and Neurosurgery (London UK), the IRCCS Istituto Auxologico

Italiano, Milan (Italy), and the Henri Mondor Hospital, Créteil (France). In total, samples from three Italian Cohorts (A,B for serum measurements; C for whole blood detection), one French Cohort (for detection in plasma) and three UK Cohorts (A, for plasma detection; B,C for whole blood) were collected and analyzed (see **Table 1** and **2**).

Ethics statement

All eligible participants received verbal and written information about the study, and provided signed, informed consent, according to the Declaration of Helsinki. Department of Neurodegenerative Disease, UCL Institute of Neurology University College London and National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London: the study was approved by National Hospital of Neurology and Neurosurgery & Institute of Neurology Joint Research Ethics Committee (Central London REC 3). Centre National de référence maladie de Huntington, GHU Chenevier Mondor, Créteil: the study was approved by the CPP (Comité de protection des personnes) Henri Mondor, Créteil, France. National Neurological Institute-IRCCS “Carlo Besta”: the study was approved by the Istituto Neurologico “Carlo Besta” Institutional Review Board. IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano: the study was approved by The Ethics Committees of IRCCS Istituto Auxologico Italiano “Comitato Etico dell’IRCCS Istituto Auxologico Italiano di Milano”.

Patients exclusion/inclusion criteria

Symptomatic HD patients. This group included patients that were positive on the molecular test for the presence of a

CAG triplet with >35 repeats in the Huntington gene. They also manifested clinical signs and symptoms of HD. Clinical assessments of motor signs, disease staging and total functional capacity (TFC) were determined with the Unified Huntington’s Disease Rating Scale (UHDRS). The age at onset was considered the time when clear motor signs and symptoms were first noticed.

Pre-HD individuals. We enrolled subjects that had more than 35 CAG triplet repeats in the Huntington gene, with no clinical symptoms or signs of the disease, and a UHDRS motor diagnostic confidence score of <4. For each pre-HD individual, the estimated probability of onset within the next 5 years was calculated on the basis of the number of CAG repeats and his/her present age, according to Langbehn [19].

Control individuals. This group included volunteers with no neurodegenerative disorders. Patients and controls were excluded from the study who were <18 years old and had known major medical conditions in addition to the primary genetic disorder.

Blood sampling and processing

For patients and control subjects from Henri Mondor Hospital, Créteil, and from the Neurological Institute-IRCCS “Carlo Besta” in Milan, blood samples were always withdrawn after an overnight fast. For patients from IRCCS Istituto Auxologico Italiano in Milan, blood samples were withdrawn after breakfast. From UCL Institute of Neurology, London, non-fasted samples were withdrawn.

Table 1. Clinical and genetic characteristics of HD, preHD and healthy patients.

| Samples | | | N° | Gender (F/M) | Age | CAG Size | |
|-------------|------------------|---------------|----------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Serum | Italian Cohort A | controls | 32 | 20/12 | 43(28–69) | - | |
| | | preHD | 5 | 3/2 | - | 42(38–44) | |
| | | HD | 22 | 8/14 | 53(32–79) | 45(39–51) | |
| | Italian Cohort B | controls | 7 | - | 39(36–58) | - | |
| | | HD | 7 | - | 53(35–75) | 43(41–45) | |
| | Plasma | French Cohort | controls | 22 | - | 55(26–82) | - |
| preHD | | | 4 | 2/2 | 39(36–41) | 43(42–44) | |
| HD* | | | 40 | 21/15 | 44(25–65) | 44(40–50) | |
| UK Cohort A | | controls | 30 | 19/11 | 47(26–72) | - | |
| | | preHD | 22 | 11/11 | 38(23–53) | 43(40–47) | |
| | | HD | 65 | 35/30 | 48(22–80) | 45(39–64) | |
| Whole blood | | UK Cohort B | controls | 8 | 4/4 | 45(28–63) | - |
| | | | preHD | 10 | 7/3 | 42(27–54) | 42(40–44) |
| | | | earlyHD | 11 | 5/6 | 48(33–67) | 43(40–48) |
| | moderateHD | | 11 | 7/4 | 50(28–63) | 49(41–56) | |
| | UK Cohort C | controls | 16 | 7/9 | 46(25–68) | - | |
| | | preHD | 11 | 5/6 | 44(28–56) | 42(38–44) | |
| | | earlyHD | 15 | 10/5 | 49(33–65) | 43(40–49) | |
| | Italian Cohort C | moderateHD | 9 | 6/3 | 65(29–77) | 48(41–56) | |
| | | controls | 23 | 13/10 | 36(21–60) | - | |
| | | preHD | 4 | 3/1 | 36(28–42) | 46(40–47) | |
| | | HD | 24 | 12/12 | 47(28–68) | 45(41–83) | |

Italian Cohort A, Istituto Auxologico Italiano, Milano; Italian Cohort B, National Neurological Institute “Carlo Besta” Milan; French Cohort, Henry Mondor Hospital, Creteil; UK Cohort, National Hospital for Neurological and Neurosurgery.

*sex, age and CAG missing for 4 samples. Age and CAG size are expressed as median values (min-max).

doi:10.1371/journal.pone.0022966.t001

Table 2. Medical treatments.

| Samples | | | NLPs | BDZs | SSRIs | SSNRIs | TCA | Other | No drugs |
|---------------|------------------|-------|------|------|-------|--------|-----|-------|----------|
| Serum | Italian Cohort A | HD | 6 | 4 | 5 | 1 | - | 7 | 4 |
| | | preHD | - | - | - | - | - | - | 5 |
| | Italian Cohort B | HD | 3 | 2 | 3 | - | - | 2 | 4 |
| | | preHD | - | - | - | - | - | - | - |
| Plasma | French Cohort | HD | 10 | 6 | 9 | - | 5 | 11 | 16 |
| | | preHD | - | - | - | - | - | - | 4 |
| | UK Cohort A | HD | 7 | 1 | 7 | 1 | - | 10 | 7 |
| | | preHD | - | - | - | - | - | - | - |
| Blood | UK Cohort B | HD | 8 | 4 | 4 | 1 | 2 | 13 | 3 |
| | | preHD | - | - | 2 | - | - | 1 | 7 |
| | UK Cohort C | HD | 3 | - | 8 | 1 | - | 5 | 8 |
| | | preHD | - | - | 3 | - | - | 2 | 7 |
| | Italian Cohort C | HD | 15 | 7 | 8 | 3 | 1 | 4 | 11 |
| | | preHD | - | - | - | - | - | - | 4 |

NLPs, neuroleptics; BDZ, benzodiazepines; SSRIs, selective serotonin reuptake inhibitors; SSNRIs, selective serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors; TCAs, tricyclic antidepressants.

doi:10.1371/journal.pone.0022966.t002

Plasma

French Cohort. 5 ml of blood were collected in EDTA-treated tubes between 9:00 and 12:00 a.m. Blood samples were maintained at room temperature (RT; 20–25°C) until plasma separation, which was performed up to 4 to 5 hours later. Tubes were centrifuged for 20 minutes at 3000×g in order to separate plasma from cellular components; plasma samples were stored in 1 ml aliquots at –80°C. Control, HD, and preHD subjects were recruited on the same day.

UK Cohort A. 5 ml of blood were collected in EDTA-treated tubes between 2:00 pm and 5:00 pm. Blood samples were maintained at RT until plasma separation, which was performed within 2 hours. Blood was transferred to a histopaque tube (A6929 ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®.1077 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged for 10 minutes at 1000×g in order to separate plasma from cellular components; plasma samples were stored in 1 ml aliquots at –80°C and shipped in 200 µl aliquots.

Serum

Italian Cohort A. 3 ml of blood were collected between 9:00 and 12:00 a.m., after breakfast. Blood samples were maintained at RT for 1 hour, and serum was separated by centrifugation at RT for 10 minutes (2000×g). Serum samples were stored in 150 µl aliquots at –80°C.

Italian Cohort B. 3 ml of blood were collected between 9:00 and 12:00 a.m., after an overnight fast. Blood samples were maintained at RT for 1 hour, and serum was separated by centrifugation at RT for 10 minutes (2000×g). Serum samples were stored in 150 µl aliquots at –80°C.

RNA

UK Cohort B, C and Italian Cohort C. Whole venous blood was collected in an evacuated blood collection tube (PAXgene™ Blood RNA Tube, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) that contained a stabilizing additive between 2:00 pm and 5:00 pm. The PAX tubes were left at room temperature for 2 hours as per Qiagen protocol and then stored at –80°C until RNA extraction.

BDNF ELISA

Plasma and serum samples were assayed for BDNF protein levels with the BDNF Emax ImmunoAssay System (Promega, Madison WI, USA). In order to minimize inter-sample variance resulting from experimental variation, all samples were measured simultaneously and with BDNF ELISA kits from the same batch. Internal standards for the BDNF ELISA kit were used as suggested by [20] and consisted of (a) a standard curve performed in each experiment to allow BDNF protein quantification, and (b) one standard sample present on all plates. Plasma and serum aliquots were thawed on the same day of the experiment at 9:00 a.m. Plasma was diluted at 1:20 in PBS1X; serum samples were diluted at 1:300 in PBS1X. Each plasma and serum sample was tested for BDNF content in three independent ELISA assays. Plasma and serum dilutions were tested in triplicate on each ELISA plate. A Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader was used to read absorbance at 450 nm.

RNA extraction

Total RNA was extracted from whole blood with the PAXgene™ Blood RNA System Kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, CH). Total RNA from brain was isolated from 200–300 mg of human brain tissue with 2 ml of TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The tissue was then homogenised in liquid nitrogen with a mortar and pestle. To enhance the RNA yield, the samples were precipitated by adding 2 µl of glycogen solution (10 mg/ml) in isopropanol, and incubating at –80°C overnight. Total RNA concentration was measured with a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA quality was verified by electrophoresis of 1 µg from each sample on an agarose gel. The total RNA was stored in aliquots at –80°C.

Reverse transcription of RNA

250 ng of total RNA was reverse-transcribed to single-stranded cDNA with Superscript III RNaseH- reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers in a volume of 20 µl, according to the manufacturer's instructions.

Two independent reverse transcription reactions were performed for every RNA stock. For the analyses of BDNF mRNA isoforms in whole blood, 2 µg of total RNA was reverse-transcribed to single stranded cDNA. For the analyses of BDNF mRNA in the cortex, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed to single stranded cDNA.

Real-time PCR

Three independent PCR analyses were performed for each of two independent reverse transcription reactions; thus, a total of six independent measurements were performed for each of the analysed mRNA. We used an iCycler Thermal Cycler with a Multicolour Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). All reactions were performed in a total volume of 25 µl that contained 5 µl of cDNA (1:10 dilution of reverse transcribed samples for BDNF, ROCK1, ANXA1, GAPDH, B2M and β-actin amplification or 1:200 dilution of reverse transcribed samples for EAR amplification), 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM dNTPs, 25 units/ml iTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR Green I with 10 nM fluorescein and stabilisers (iQTM SYBR Green Supermix-Biorad, Hercules, CA, USA), and 0.3 µM each of forward and reverse primers. The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 95°C for 3 minutes, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C. Fluorescence was quantified during the 60°C annealing step, and product formation was confirmed with a melting curve analysis (55°C–94°C).

The BDNF-specific primers were based on the BDNF coding sequence (GenBank accession number AF411339), as follows: BDNF 5'-TAACGGCGGCAGACAAAAGA-3'; BDNF 5'-GAAGTATTGCTTCAGTTGGCCT-3'. The amplification product was 101 base pairs (bp) long. The expressed Alu repeat (EAR)-specific primers were based on the human interspersed Alu repetitive sequence. The primer sequences were: EAR 5'-GAGGCTGAGGCAGGAGAATCG-3' EAR 5'-GTGCCCCAGGCTGGAGTG-3'. The amplification product was 87 bp long. The ANXA1 specific primers were set up referring to GenBank accession number NM_000700.1. The primer sequences were Fw: 5'-GAGCCCTATCCTACCTTCAAT-3'; Rev: 5'-GATGGTTGCTTCATCCACACCT-3'. The amplification product was 88 bp long. The ROCK1 specific primers were set up referring to GenBank accession number NM_005406.2.

The primers sequences were Fw: 5'-AGGTTAGGCGGAAATGGTGTAGAA-3'; Rev: 5'-CCTCTCCTTTATCTTCTTCCAAGTC-3'. The GAPDH specific primers were set up referring to GenBank accession number NC_000012.10. The primer sequences were: GAPDH Fw: 5'-AGCTGAACGGGAAGCTCACT-3' GAPDH Rev: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTTG-3'. The amplification product was 67 bp long. The B2M specific primers were set up referring to GenBank accession number NC_000015.8. The primer sequences were: B2M Fw: 5'-GGAGAGA-GAATTGAAAAAGTGGAGC-3'; B2M Rev: 5'-GGCTGTGACAAAGTCACATGGTT-3'. The amplification product was 143 bp long. The β-actin specific primers were set up referring to GenBank accession number NC_000007.12. The primer sequences were: Fw: 5'-AGTGTGACGTGGACATCCGCA-3'; Rev: 5'-GCCAGGGCAGTGATCTCCTTCT-3'. The amplification product was 112 bp long.

Qualitative PCR

Semi-quantitative PCRs were performed in a total volume of 50 µl, consisting of 100 ng of cortex cDNA or 200 ng of blood cDNA, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM each of forward and reverse primers, and

2.5 units of Taq polymerase (Invitrogen). The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles (or 40) of 1 minute at 94°C, 45 s at different temperatures, according to the melting temperature of the primers, and 45 s at 72°C. The sequences of all primers, their annealing temperatures, and the lengths of the PCR products are provided upon request.

Statistical analyses

As BDNF values do not have a normal distribution in both control and HD populations, the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple comparison test or Mann-Whitney two-tailed U-test were used for the statistical analyses, with significance being set at $P < 0.05$. Median values were chosen because of the skewed distribution of the data. In the box plots, the boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers appear above and below the box to indicate the 90th and 10th percentiles. Unpaired t-test and Spearman's rank correlation coefficient were also used.

Results

BDNF protein detection

BDNF in plasma. In a preliminary ELISA assay we noticed that the time between withdrawal and plasma preparation affected the detectable BDNF levels in plasma. Plasma prepared 1 hour after blood withdrawal showed BDNF values of 4 ± 2.4 ng/ml that were lower than those prepared at 4 hours (14 ± 2.1 ng/ml) and 24 hours (16 ± 2.4 ng/ml) after withdrawal (**Fig. 1A**) ($P < 0.05$ compared to samples processed after 1 hour, unpaired t-test). The higher than expected BDNF levels measured in these plasma samples could be due to BDNF release from platelets [7].

To devise a more standardised plasma preparation, and to ensure a significant number of samples available for testing, we conducted our first study on plasma samples from the Blood Bank of the Henry Mondor Hospital in Creteil (French Cohort, see **Table 1**). The subjects included 40 with HD, 4 with preHD, and 22 controls. As shown in **Fig. 1B**, an increase in plasma BDNF protein level was observed in HD patients at early, moderate and advanced HD stages, compared to controls ($P < 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test **Fig. 1B**). Although the median value of BDNF content tended to increase from the early to moderate or advanced stages, the difference between these groups was not significant ($P > 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test). Furthermore, we found no correlations between BDNF content and disease progression measured by TFC and UHDRS scores, or the CAG-repeat length ($P > 0.05$, Spearman test). Antidepressants were reported to increase BDNF levels in the serum of depressed subjects [21]. We found no differences in BDNF content between antidepressant-free and antidepressant-treated HD subjects ($P > 0.05$, Mann-Whitney two-tailed U-test).

To evaluate further whether increased levels of blood BDNF protein were consistently detected in human HD blood, we increased the number of subjects tested. A new batch of plasma samples was obtained from University College London (UCL, UK Cohort A, **Table 1**), including 30 controls, 22 preHD, and 65 HD. According to UCL internal procedures, plasma preparations for the UK Cohort A were performed differently than those prepared for the French Cohort. Blood samples were collected after breakfast (and not after an overnight fast as for the French Cohort) and plasma samples were prepared within 2 hours of

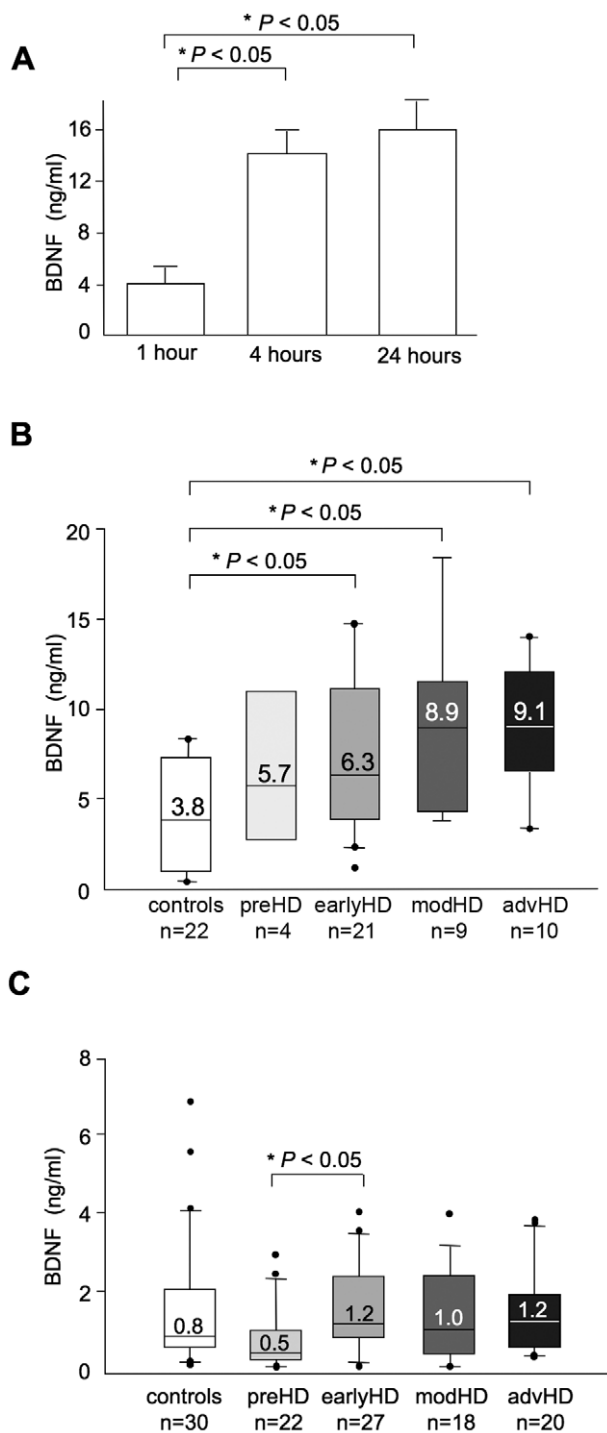


Figure 1. BDNF protein in human plasma measured by ELISA. (A) BDNF content in plasma samples from 3 control subjects. After blood withdrawal, samples remained at RT for 1, 4, and 24 hours before the plasma was isolated ($p < 0.05$ compared to sample processed after 1 hour, unpaired t-test). (B) BDNF protein levels in plasma samples from the French Cohort, prepared 4 hours after blood withdrawal. Control and HD subjects exhibited a large variability in plasma BDNF levels. Values inside the boxes are the medians for the group. $P < 0.05$, controls vs early HD, $P < 0.05$ controls vs moderate HD and $P < 0.05$ controls vs advanced HD, according to Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (C) BDNF protein contents in plasma samples from UK Cohort A, prepared 2 hours after blood withdrawal. BDNF protein in preHD was significantly lower than that in early HD, $P < 0.05$ according to Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. doi:10.1371/journal.pone.0022966.g001

blood withdrawal (compared to 4 hours after for the French Cohort). **Fig. 1C** shows that the median BDNF level in plasma from control subjects of the UK Cohort A was 0.8 ng/ml compared to the 3.8 ng/ml measured in plasma samples from controls of the French Cohort (**Fig. 1B**). This is likely to be due to differences in samples preparation. The lower than expected BDNF levels found in the UK cohort could be due to lower platelet activation and minimal BDNF release. Therefore, we analysed the samples from these two cohorts separately. We found no difference in BDNF levels between the HD and control populations ($P > 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test; **Fig. 1C**). This contrasted with the results from the French Cohort, which indicated that the BDNF protein content was significantly higher in HD patients compared to controls (**Fig. 1B**). The most likely explanation for these different results was the different protocols used in the plasma preparation and the many variables related to the patients recruitment. Further, we found that BDNF protein content in the UK Cohort A did not correlate with disease progression. Additionally, we found no difference in BDNF content between antidepressant-free and anti-depressant treated HD subjects ($P > 0.05$, Mann-Whitney two-tailed U-test). Our analyses revealed also that BDNF protein in 22 preHD subjects was lower than in early HD ($P < 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test; **Fig. 1C**). We calculated the 95% probability that preHD subjects would exhibit onset symptoms within 5 years (based on the number of CAG repeats) [19]. We found a tendency of BDNF to decrease in subjects predicted to be near disease onset, but the correlation was not significant ($P > 0.05$, Spearman test). Five out of the 8 subjects close to onset (5-year probability > 0.3) had BDNF levels in the lower range while the other 3 subjects, which exhibited BDNF levels higher or similar to controls, were predicted to be further away from onset (**Figure S1**).

In conclusion, control and HD subjects from two independent Cohorts showed completely different BDNF levels. This is likely to be due to differences in samples preparations or intra-group variability, because BDNF levels are sensitive to a variety of factors (for example age and sex) [15,16,17,22]. However, no sex- and age-related changes in BDNF blood concentration were found both in control and HD populations.

BDNF in serum. A previous report from some of the authors (AC and JS) of this paper indicated a decrease in BDNF level in human HD blood [13]. We have asked this group to join our study and to provide us with their old/new samples (control and HD) and/or re-perform this measurement. A first cohort (Italian Cohort A, see **Table 1**) including 32 controls, 5 preHD, and 22 HD patients was recruited by AC Unit at Istituto Auxologico in Milan and BDNF content was first evaluated in July 2009 in a subgroup including 29 control and 19 HD samples. A not significant decreasing tendency in serum BDNF content was observed in HD subjects compared to controls (median BDNF level in serum from controls was 10.7 ng/ml compared to 5.9 ng/ml in HD subjects; $P > 0.05$ compared to controls, Mann-Whitney Test). In October 2009 a second evaluation on the same samples (new aliquots of serum), added of 1 control, 4 preHD and 3 HD, was performed by other authors on this paper (BV and CZ). Again, serum BDNF level was similar in control and HD patients ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test) (**Fig. 2A**). Because the variability in serum BDNF content was high in both the control and HD populations, a replicate of this experiment was performed 6 days later with the same ELISA kit and reagents. This experiment confirmed the high variability in serum BDNF in both groups, and the absence of a

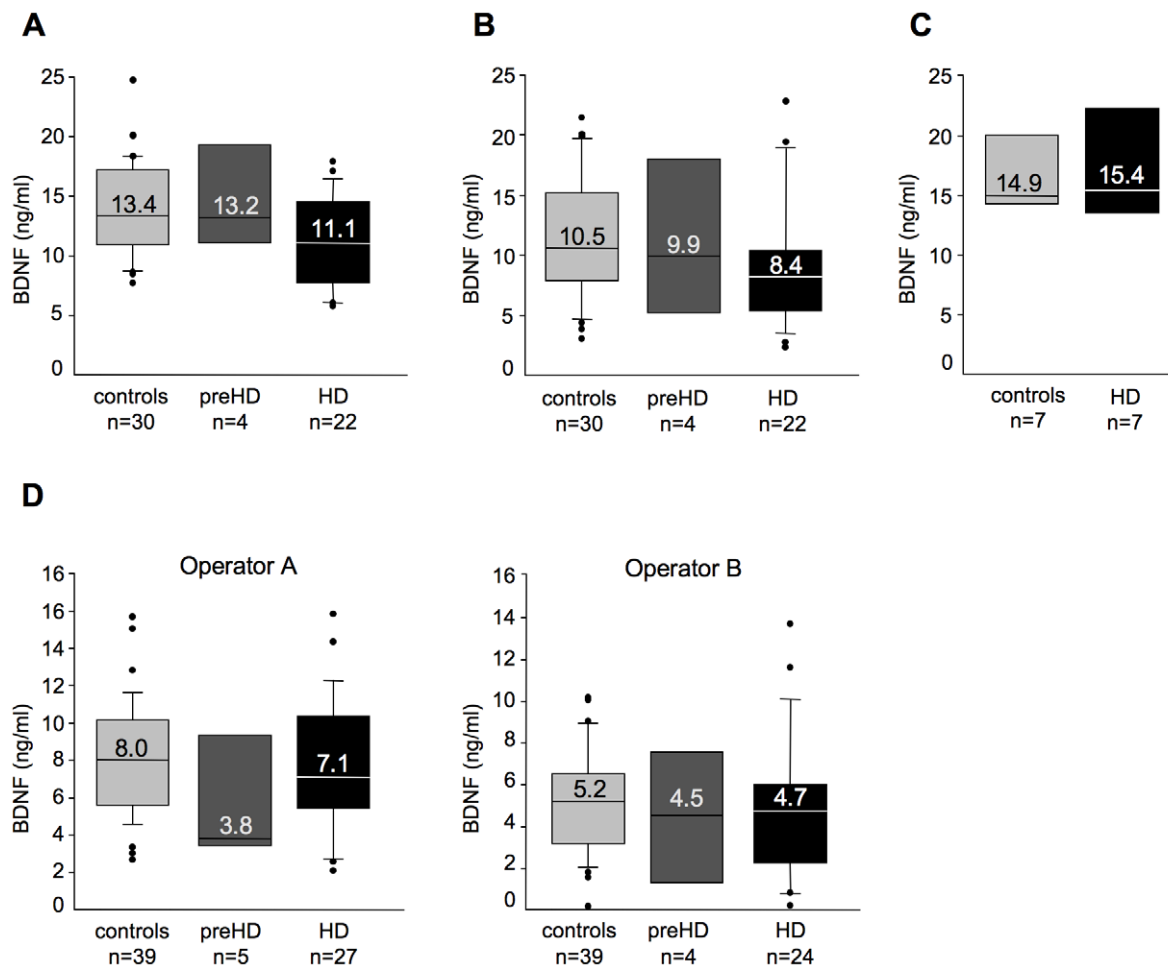


Figure 2. BDNF protein measured in human serum. (A) BDNF protein in serum from controls and subjects with preHD or HD in Italian Cohort A. (B) The samples in A were tested 1 week later. (C) BDNF levels in control and HD serum samples from the Italian Cohort B. (D) Serum BDNF content determined 3 months later. The following samples were tested: (i) thirty-nine controls, including 32 from Italian Cohort A and 7 from Italian Cohort B. From Italian Cohort A 30 had been tested previously and 2 were new samples. All those from Italian Cohort B had been tested previously; (ii) five with preHD from Italian Cohort A, including 4 samples that were previously tested and one new sample; (iii) twenty-seven with HD, including 20 out of 22 samples from Italian Cohort A and 7 samples from Italian Cohort B. Duplicate experiments were performed in parallel by two different operators (operator A, JS; operator B, BV). Operator B: BDNF protein content was undetectable in 1 preHD sample and in 3 HD samples which were excluded from data analyses.

doi:10.1371/journal.pone.0022966.g002

significant difference in serum BDNF levels between control and HD patients ($P > 0.05$) according to Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (Fig. 2B). We also observed that 16 out of 30 controls and 20 out of 22 patients with HD showed significant differences between the first and second measurements ($> 15\%$). These results suggested that caution should be taken when interpreting data on BDNF serum, because inter-assay variation is very high despite our best efforts at methodological consistency (Text S1). In parallel, we tested a small group of serum samples (7 from controls and 7 from HD patients, Italian Cohort B, see Table 1) obtained by CM and SD at the National Neurological Institute "Carlo Besta" in Milan. Again, no differences in the BDNF content were observed between control and HD subjects ($P > 0.05$, Mann-Whitney Test) (Fig. 2C).

To try to limit inter-assay variations in the BDNF analyses on serum we have organized our assay in order to test all serum samples from Italian Cohorts A and B (new serum aliquots that were never thawed before) on the same day and BV and JS have worked in parallel with the same sample dilutions, ELISA assays, reagents, solutions, and bench. This experiment was performed in

January 2010. As shown in Fig. 2D, both operators found no significant differences in serum BDNF protein content between control, pre-HD and HD subjects (JS: $P > 0.05$; BV: $P > 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test). Inter-assay variation still remained very high (Text S1). Moreover, the absolute amounts of BDNF content in serum were lower in this measurement than those found in the previous measurement (Fig. 2A), suggesting that the storage conditions (-80°C) affected BDNF stability in serum samples. These data suggested that measurement of BDNF protein in human serum should be interpreted with extreme caution. Further, in contrast to previous findings [13], we did not detect any difference in serum BDNF content between control and HD patients.

BDNF mRNA in control and HD patients

There is a remarkable reduction in brain BDNF mRNA levels in patients with HD as judged from analyses of post-mortem tissue [23]. Studies in mouse models of HD indicated that blood BDNF mRNA also gradually diminishes with disease progression [11,12]. Due to our failure to detect reliably the BDNF protein in human

blood, we decided to measure BDNF mRNA in the blood of patients with HD and controls. In our initial RT-qPCR assays, we measured BDNF mRNA levels in the blood of 8 controls, 10 preHD, and 22 HD subjects (UK Cohort B, see **Table 1**). BDNF mRNA levels showed a tendency to decrease in HD patients with respect to controls and preHD samples after normalisation to the mRNA of the housekeeping gene, glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH), although this difference was not statistically significant ($P > 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test; **Fig. 3A**). Similarly, when BDNF mRNA from the same samples was normalised to $\beta 2$ -microglobulin, a component of major histocompatibility class I molecules present in all nucleated cells, we found that BDNF mRNA levels were not significantly different among control,

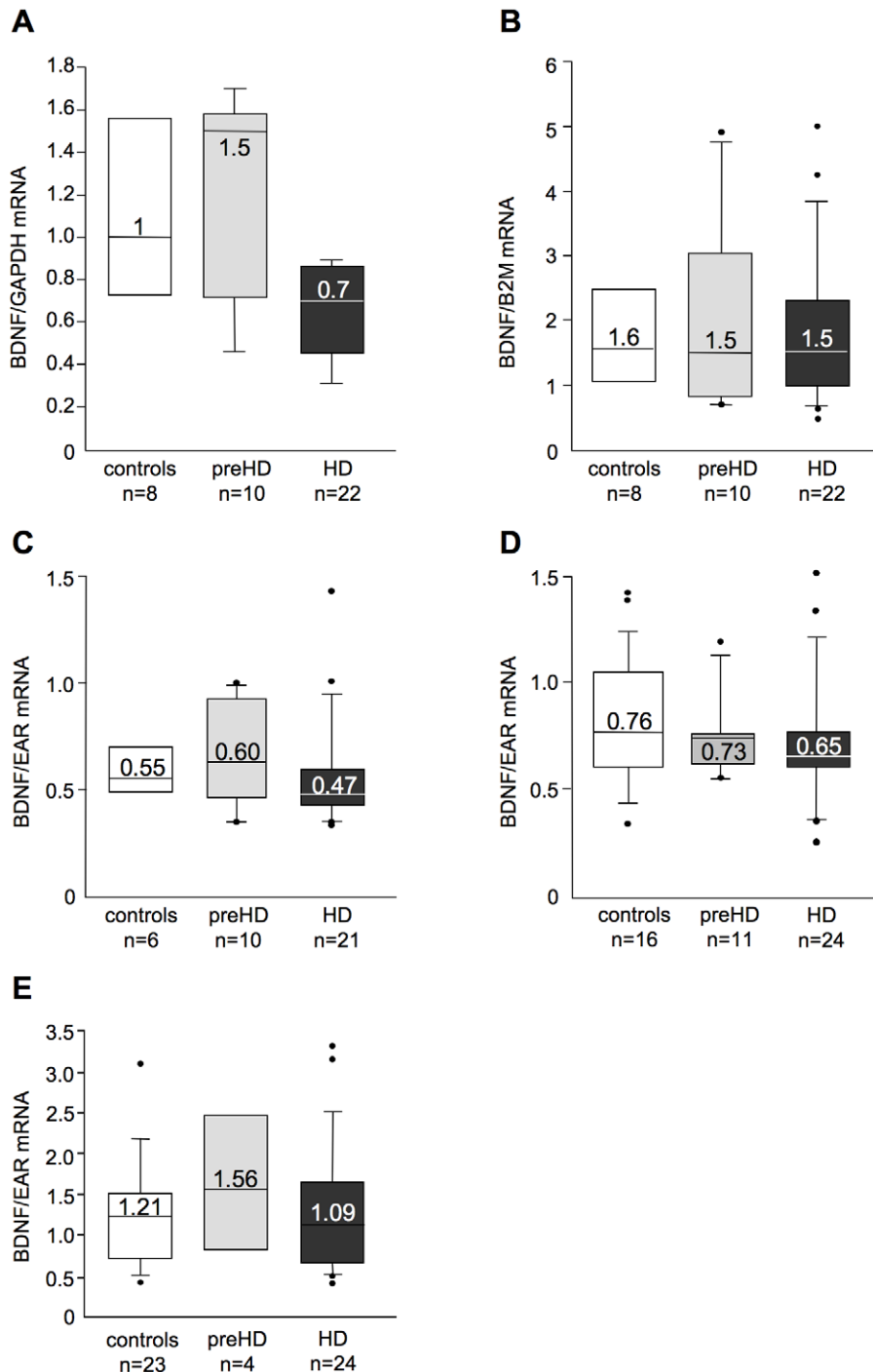


Figure 3. Analyses of BDNF mRNA in whole blood from control and HD subjects. (A) Samples from UK Cohort B: BDNF mRNA levels normalised with GAPDH mRNA. **(B)** Samples from UK Cohort B: BDNF mRNA levels normalised with $\beta 2$ -microglobulin (B2M) mRNA. **(C)** BDNF mRNA content in the same samples shown in (A) was normalised with EAR. **(D)** Samples from UK Cohort C: BDNF mRNA was normalised with EAR. **(E)** Samples from Italian Cohort C: BDNF mRNA was normalised with EAR. doi:10.1371/journal.pone.0022966.g003

preHD, and HD ($P > 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test) (**Fig. 3B**). Since we have previously demonstrated the possibility of erroneous quantification of a target gene in human blood when a conventional normalization strategy based on a single control gene is used [24], we decided to re-analyse the samples still available by using a more accurate strategy for mRNA normalisation in RT-qPCR based on amplification of the expressed Alu repeat (EAR) [24]. When BDNF mRNA content in blood was normalised over EAR, we found no differences among control ($n = 6$), preHD ($n = 10$), and HD subjects ($n = 21$) ($P > 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test) (**Fig. 3C**). Similar results were obtained on two additional sets of samples (16 control, 11 preHD, and 24 HD samples) from UK Cohort C ($P > 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test) (**Fig. 3D**), and 23 control, 4 preHD, and 24 HD samples from Italian Cohort C (**Fig. 3E**) ($P > 0.05$ by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test). These analyses confirmed that the blood level of BDNF mRNA is similar in control and HD patients.

Validation of previously identified transcriptomic biomarkers

A previous microarray study identified a large number of significantly altered mRNAs in HD blood, from which 12 genes were selected to discriminate between controls and HD patients [25]. Some of the HD-related changes in the expression of these 12 genes were confirmed in one independent study [26], but not in

a second one [27]. Here we analysed the expression of 2 of the putative marker genes in a selection of samples from the Italian Cohort C that were previously tested for BDNF mRNA content. We focused on the annexin A1 (ANXA1) and rho-associated protein kinase-1 (ROCK1) genes, because their expression was upregulated in HD blood and was sensitive to pharmacological treatment [25,26]. Our RT-qPCR experiments indicated that ANXA1 and ROCK1 mRNA levels were similar in control and HD patients (**Fig. 4A-B**). Two different normalization factors were used, β -actin, as reported in the original article [25] (ANXA1: $P > 0.05$ controls vs HD; ROCK1: $P > 0.05$ controls vs HD, Mann-Whitney test) and EAR [24] (ANXA1: $P > 0.05$ controls vs HD; ROCK1: $P > 0.05$ controls vs HD, Mann-Whitney test), with similar results although normalization over β -actin caused increased variability. Our results were consistent with previous findings from Runne et al., [27], who used a larger number of cases and the same qPCR primer pairs for the selected targets, but also saw no differential expression in ANXA1 and ROCK1 between preHD and control samples. Our data confirm that transcriptomic analyses of these individual genes may not be suited for tracking HD onset and progression in human blood and that a reliable normalisation procedure, such as EAR, is necessary.

Discussion

This multicentre study included the largest number of HD subjects, to date, that have been tested for peripheral BDNF mRNA and protein expression, and represents the most comprehensive experimental analysis of BDNF in peripheral

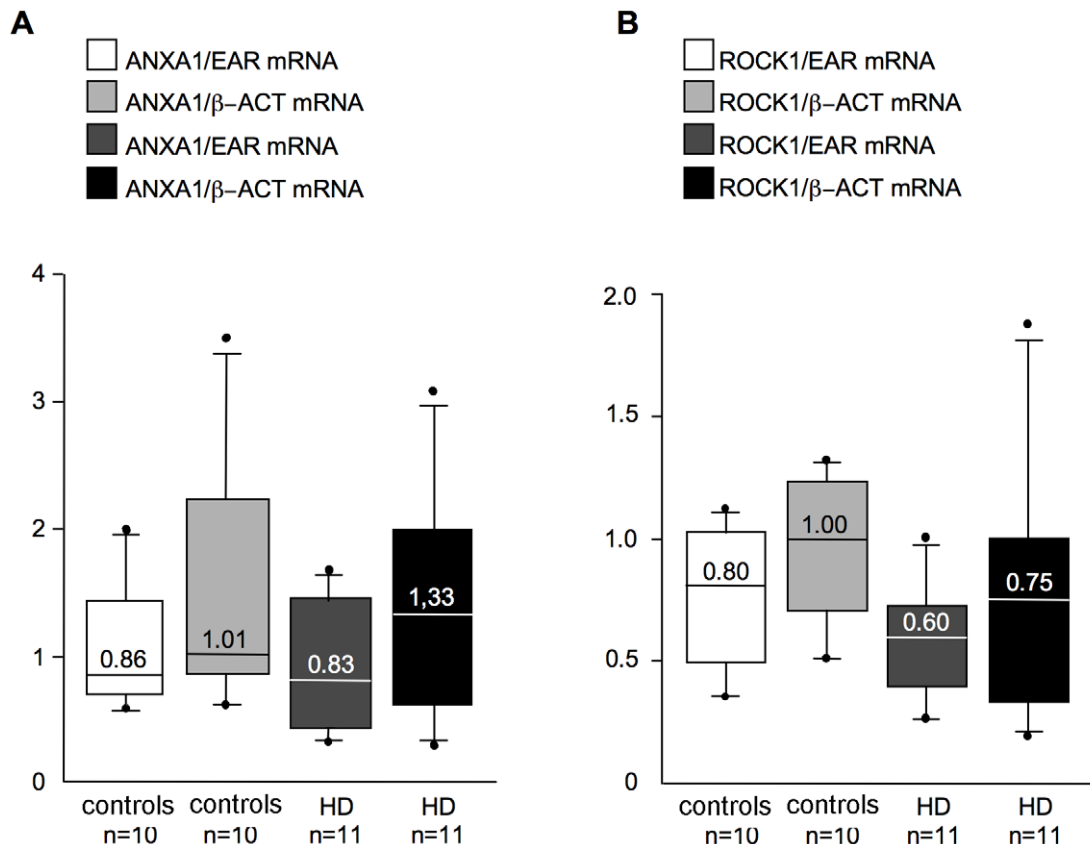


Figure 4. mRNA levels of other HD-related genes in control and HD patients. Samples are from Italian Cohort C. Blood mRNA levels of (A) ANXA1 and (B) ROCK1 were measured with two different normalisation strategies (β -actin mRNA levels (β -ACT), according to [25], and EAR levels, according to [24].

doi:10.1371/journal.pone.0022966.g004

human blood. We show that measuring BDNF in the blood of patients with HD was not informative of disease onset or progression. Moreover, we have demonstrated that many issues concerning BDNF protein detection in blood (in particular in serum) may make reliable measurements difficult. This is true for HD, but could be extended to other diseases and to all assays in which serum and plasma BDNF levels have been measured. We also showed that, with the appropriate normalisation procedures [24], the evaluation of BDNF mRNA revealed no differences between control and HD subjects. In spite of this, we propose pPCR against EAR [24] as a precise and reliable strategy to detect the level of BDNF mRNA in total blood as well as the level of other mRNAs.

The measure of circulating BDNF protein

In this study, we analyzed samples from a total of 91 controls, 31 preHD, and 134 HD subjects. We found that the detection of BDNF protein in human blood samples (plasma and, in particular, serum) is extremely complex. In particular, variability in serum is still prohibitive for consideration as a routine clinical tool, and caution should be exercised when undertaking research studies of BDNF in such a compartment or in plasma from pre-existing banks. First, in our study, different results were obtained when BDNF plasma levels were measured in different cohorts. Second, intra-group variability can be a major problem especially since BDNF levels are affected by a number of individual factors [22]. Third, several methodological aspects related to blood collection, sample storage and BDNF protein detection may contribute to the variability of its measurement in blood. While considering this, no differences in BDNF protein content were found between control and HD patients (in both plasma and serum).

Critical aspects to consider when approaching BDNF protein detection in plasma samples. We found that sample collection and preparation may influence the level of BDNF protein measured in plasma. Particularly, we found that the time spent on the bench at RT before plasma preparation affects BDNF content in plasma (**Fig. 1A**). Thus, more robust and standardised procedures are required for plasma preparation. BDNF was enough stable when plasma was stored at -80°C , even after 1 year (data not shown). This is due to the presence of EDTA in blood collection tubes, which reduces the activity of proteases, thus increasing BDNF protein stability. Although proteases are not completely inactivated in plasma samples, our studies and previous studies demonstrate that plasma is intrinsically more stable than serum and therefore, more useful for protein analyses in biomarker studies [28]. Plasma banks might be a suitable method of storing plasma samples for future BDNF protein analyses. However, if the disease of interest is a rare genetic disease and only small cohorts of patients are available, small variations in the protocols used for different blood banks may introduce issues related to plasma sample preparation that affect BDNF measure. In fact, we show here that plasma samples of control and HD subjects from two independent Cohorts showed different BDNF levels (**Fig. 1B** and **Fig. 1C**). The effort conducted within the EURO-HD network (<http://www.euro-hd.net/html/network>) in coordinating Clinical Centres within Europe is a very welcome and worthwhile strategy as it aims at the application of standardised protocols in response to criteria identified by specialists of tissue banking and also encourages sample deposition in a single bank (for HD studies: BioRep s.r.l. in Milano, <http://www.biorep.com>). This effort is sustained also by the fact that BDNF ELISA works well on plasma samples (**Text S1**).

Testing BDNF protein in serum samples: issues that remain to be resolved. Compared to our findings on BDNF in

plasma, we noticed that BDNF appears to be less stable in serum samples prepared following standardised protocols (see **Material and Methods**) and stored at -80°C . The aspect of protein instability in serum is well known to enzymologists and biochemists [29,30]. Proteolytic enzymes in the clotting cascade may greatly, and randomly, affect the level of a given protein in serum samples. The activity of proteolytic enzymes may continue also with serum storage, causing sample variability and instability by sequential protein degradation. We have found that BDNF is unstable in frozen samples stored at -80°C as previously raised by other authors who showed that serum BDNF is rapidly degraded with storage at -20°C [20]. Moreover, the collection of blood in tubes containing protease inhibitors has little effect on serum protein preservation [31]. Instability of BDNF protein in serum samples clearly emerges from the high inter-assay variation observed in our study also when the same samples have been tested after one week. This is not due to the ELISA assay itself that has been extensively validated in cells, brain tissue and plasma samples [22,23,32]. Based on these considerations, one could think to analyse serum samples immediately after preparation. However, if the disease under investigation is rare, it will be very difficult to recruit a number of patients large enough for statistical analyses. In addition, we found that inter-assay variation still remains high when the same serum (but not plasma) samples were analysed in parallel, on the same day, with the same BDNF ELISA kit and solutions, by two different operators (JS and BV) (**Fig. 2D**). This result is difficult to interpret. The only possible explanation at this stage is that serum samples may be subjected to uncontrolled biological (and technical) variations. We suggest that protein stability in serum samples still remain a complicated and unsolved issue that renders serum samples inappropriate for the detection of BDNF (and likely also other proteins) in biomarker studies.

Data about BDNF in blood need to be critically re-interpreted. Our study suggests also that changes in serum and plasma samples previously reported to be associated with several disorders might be considered with cautions. By using the PubMed search engine with the keywords “BDNF and human and serum” and “BDNF and human and plasma” we analysed the literature published between 2003 and May 1, 2011 on BDNF in blood. 351 articles emerged from the first search while 288 for the second, some of which could be overlapping. We have selected 30 papers reporting BDNF measurement in human serum and 20 papers in human plasma that contained enough methodological aspects for a critical analysis (**Table S1** and **Table S2**). Even among these cases there are reports in which BDNF protein concentration were described with limited details. BDNF measured in serum and plasma was variable under different pathological conditions, but also among control groups. Serum BDNF content varied from approximately 0.143 to 80 ng/ml, and plasma BDNF content varied from 10 to 10000 pg/ml. Such a high variability can be due to different criteria for subject selection, sample collections and methodological aspects that can seriously affect BDNF detection in blood. Criteria for patient selection are not always available in published papers. In addition, most studies have not indicated whether measurements were made under fasting or fed conditions, as it is also known that diet can influence BDNF levels [22]. Most papers do not sufficiently describe the way blood was collected. Lommatzsch et al., (2005) have shown that different types of blood collection tubes (EDTA or heparin-treated) can influence the BDNF content detected in plasma [17]. Many papers do not contain information on the time and conditions of blood storage that strongly influence the amount of BDNF detected in plasma (see **Fig. 1A**). Temperatures and time of storage of plasma and serum samples vary among studies, thus

affecting the absolute amount of BDNF detected. We and others have found that this is true especially for serum samples [18,20]. Different ELISA assay kits have been used with different range of sensitivity, thus contributing to introduce variability. However, the two most used ELISA kits (from Promega and R&D Systems) efficiently detect BDNF. Underestimated methodological aspects can affect data interpretation and make it difficult to reach any strong conclusion about blood BDNF protein content in different pathological conditions.

The HD mutation did not affect BDNF mRNA in human peripheral blood

A large number of *in vitro* and *in vivo* studies have shown that BDNF mRNA is consistently reduced in brain tissues from HD transgenic mice and patients [10,22]. In addition, blood BDNF mRNA levels correlated with brain BDNF levels and disease progression in HD mice [11,12]. Importantly, a standardised, accurate and fast assay is available to quantitatively evaluate BDNF mRNA in human blood samples [24]. These studies initiated our investigation of the levels of BDNF mRNA in blood.

Our analyses of samples from 47 control, 25 preHD, and 70 HD subjects indicated that, in contrast to findings in HD mouse models, BDNF gene transcription was not affected in the peripheral blood of HD patients. This apparent absence of BDNF modulation in blood may arise because the transcriptional regulatory mechanisms are different in human blood and human brain. The human BDNF gene is characterised by very complex regulation as it contains nine different promoters that act independently to modulate the transcription of BDNF mRNA in a stimulus- and time- specific manner [33]. We previously demonstrated that transcription from the BDNF promoters II, IV, and VI was reduced in the brains of HD animal models and in human postmortem brain tissue [10]. In human blood, most of the BDNF is produced from mRNA isoform IX, with some very moderate involvement of mRNA I and IV (the latter being detectable only at very high PCR amplification cycles; **Figure S1**) while others, including those implicated in brain and affected by the HD mutation appeared to be silent (such as mRNA isoform II; **Figure S1**). These differences in BDNF isoforms expression between blood and brain may account for the differences observed in the effects of the HD mutation on BDNF gene transcription in these two compartments.

Furthermore, microarray studies on blood samples from healthy subjects have shown intra-individual variation in the expression of several genes due to differences in the relative proportions of specific blood cell subsets, gender, age, and the time of day at

which the blood was sampled [34]. These factors may also influence the levels of BDNF mRNA in blood. Consistently, it was not surprising that the levels of previously identified serum mRNA markers (ROCK1 and ANXA1) were unaffected by HD in our cohort of samples and in previous studies [25,27].

Conclusion

Although BDNF loss in the HD brain is implicated in the disease process [10], this study indicates that the level of BDNF in human blood is not informative (mRNA levels and plasma protein level) or reliable (protein levels in serum) as a biomarker for predicting HD onset or progression.

Supporting Information

Figure S1 A) Correlation between BDNF levels in preHD subjects and time to disease onset. **B) and C)** Semiquantitative RT-PCR analyses of human BDNF mRNA isoforms expression in adult human tissues. cDNA samples were amplified for (B) 35 and (C) 40 cycles. In blood (bl), transcripts were predominately detected from promoter IX, and at very low levels, from promoters I and IV. B, blank or RT-.

(DOC)

Text S1 BDNF ELISA interassay variability.

(DOC)

Table S1 Selection of papers about BDNF measure in serum in different pathological conditions.

(XLS)

Table S2 Selection of papers about BDNF measure in plasma in different pathological conditions.

(XLS)

Acknowledgments

We are grateful to Simona Maciotta and Lorenzo Nanetti for technical support. We thank Stephan Von Hörsten for insightful suggestions related to proteolysis in serum samples and Alessandro Ieraci for his help with statistical analyses. This study would have not been possible without the participation and consideration of those that suffer from Huntington's Disease.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CZ EC. Performed the experiments: CZ MM BV AT JS. Analyzed the data: CZ MM BV AT MV EJW JS AC EC. Contributed reagents/materials/analysis tools: CM NL EJW ACBL SJT SDD. Wrote the paper: CZ MM EC.

References

- Katerberg H, Lochner C, Cath DC, de Jonge P, Bochdanovits Z, et al. (2009) The role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) val66met variant in the phenotypic expression of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B: 1050–1062.
- Castren E, Rantamaki T (2010) Role of brain-derived neurotrophic factor in the aetiology of depression: implications for pharmacological treatment. *CNS Drugs* 24: 1–7.
- Buckley PF, Mahadik S, Pillai A, Terry A, Jr. (2007) Neurotrophins and schizophrenia. *Schizophr Res* 94: 1–11.
- Hashimoto K, Koizumi H, Nakazato M, Shimizu E, Iyo M (2005) Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: recent findings and its pathophysiological implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 499–504.
- Lee BH, Kim YK (2010) The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig* 7: 231–235.
- Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA (1996) Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res* 709: 122–301.
- Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, et al. (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemostasis* 87: 728–734.
- Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Etrrup A, et al. (2011) Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 347–353.
- HD-CRG (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971–983.
- Zuccato C, Cattaneo E (2009) Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 5: 311–322.
- Conforti P, Ramos C, Apostol BL, Simmons DA, Nguyen HP, et al. (2008) Blood level of brain-derived neurotrophic factor mRNA is progressively reduced in rodent models of Huntington's disease: restoration by the neuroprotective compound CEP-1347. *Mol Cell Neurosci* 39: 1–7.
- Apostol BL, Simmons DA, Zuccato C, Illes K, Pallos J, et al. (2008) CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice. *Mol Cell Neurosci* 39: 8–20.

13. Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, et al. (2007) Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 574–577.
14. Squitieri F, Orobello S, Cannella M, Martino T, Romanelli P, et al. (2009) Riluzole protects Huntington disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36: 1113–1120.
15. Tang SW, Chu E, Hui T, Helmeeste D, Law C (2008) Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. *Neurosci Lett* 431: 62–65.
16. Mitoma M, Yoshimura R, Sugita A, Umene W, Hori H, et al. (2008) Stress at work alters serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and plasma 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) levels in healthy volunteers: BDNF and MHPG as possible biological markers of mental stress? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 679–685.
17. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, et al. (2005) The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging* 26: 115–123.
18. Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, et al. (2011) Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* 36: 228–239.
19. Langbehn DR, Brinkman RR, Falush D, Paulsen JS, Hayden MR (2004) A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet* 65: 267–277.
20. Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, et al. (2007) Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data. *Brain Res Bull* 73: 143–149.
21. Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, et al. (2005) Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255: 381–386.
22. Zuccato C, Cattaneo E (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81: 294–330.
23. Zuccato C, Marullo M, Conforti P, MacDonald ME, Tartari M, et al. (2008) Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol* 18: 225–238.
24. Marullo M, Zuccato C, Mariotti C, Lahiri N, Tabrizi SJ, et al. (2010) Expressed Alu repeats as a novel, reliable tool for normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *Genome Biol* 11: R9.
25. Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J, Jeong H, Then F, et al. (2005) Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11023–11028.
26. Lovrecic L, Kastrin A, Kobal J, Pirtosek Z, Krainc D, et al. (2009) Gene expression changes in blood as a putative biomarker for Huntington's disease. *Mov Disord* 24: 2277–2281.
27. Runne H, Kuhn A, Wild EJ, Pratyaksha W, Kristiansen M, et al. (2007) Analysis of potential transcriptomic biomarkers for Huntington's disease in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14424–14429.
28. Yi J, Liu Z, Craft D, O'Mullan P, Ju G, et al. (2008) Intrinsic peptidase activity causes a sequential multi-step reaction (SMSR) in digestion of human plasma peptides. *J Proteome Res* 7: 5112–5118.
29. O'Mullan P, Craft D, Yi J, Gelfand CA (2009) Thrombin induces broad spectrum proteolysis in human serum samples. *Clin Chem Lab Med* 47: 685–693.
30. O'Gorman MR, Corrochano V, Roleck J, Donovan M, Pachman LM (1995) Flow cytometric analyses of the lymphocyte subsets in peripheral blood of children with untreated active juvenile dermatomyositis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 205–208.
31. Ayache S, Panelli M, Marincola FM, Stroncek DF (2006) Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels. *Am J Clin Pathol* 126: 174–184.
32. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, et al. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293: 493–498.
33. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90: 397–406.
34. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, et al. (2003) Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1896–1901.

METHOD

Open Access

Expressed Alu repeats as a novel, reliable tool for normalization of real-time quantitative RT-PCR data

Manuela Marullo^{1†}, Chiara Zuccato^{1†}, Caterina Mariotti², Nayana Lahiri³, Sarah J Tabrizi³, Stefano Di Donato², Elena Cattaneo^{1*}

Abstract

We describe a novel strategy for mRNA normalization in quantitative real-time PCR that is based on expressed Alu repeat amplification as a measure for the mRNA fraction. We show that expressed Alu repeat amplification is a fast, accurate normalization tool that can be successfully used for quantification of selected mRNA in the human transcriptome. This result is particularly important for clinical diagnosis and biomarker validation studies based on mRNA detection in human blood.

Background

Several factors hinder the reliable quantification of mRNA in gene expression studies performed in human samples, including sample availability, handling, and storage and the strategy used to normalize selected mRNA over the total mRNA fraction. With real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR), quantification errors depend on variations in the amount of total RNA or cDNA between samples, which remain difficult to determine. Various strategies have been applied in efforts to normalize these variations. Under controlled conditions of reproducible extraction of good-quality RNA, one possible strategy relies on total RNA quantification (RNA mass quantity) and/or the use of synthetic internal standards. To date, the amplification of a reference gene as the internal standard is the most frequently used approach to normalizing the mRNA fraction. This strategy is best applied when a large number of target genes are to be screened and makes inter-laboratory standardization easier than using total RNA content, which might depend on the quantification method. However, the reliable quantification of selected targets requires identification of a proper internal control gene for normalization,

one that exhibits stable expression in the given cell or tissue under investigation.

A first accurate strategy for normalization was based on the GeNorm algorithm, which allows identification of the most stably expressed control genes in a human tissue of interest. The expression of ten common reference genes is analyzed in the tissue investigated by RT-qPCR, and the GeNorm algorithm is applied to calculate the gene expression stability (M) of the different control genes. The level of the target gene is normalized over the normalization factor (NF) obtained from the geometric mean of expression value of three or more stable reference genes [1].

Although the GeNorm algorithm is a robust normalization method, the reference gene validation requires extensive experimental work and a high quantity of sample material. These requirements may represent a problem in the context of gene expression studies involving the human transcriptome for which a limited amount of human tissue samples are available. Moreover, the choice of stable control genes becomes particularly difficult and is an expensive and lengthy process in pathological conditions characterized by transcriptional dysregulation. Altered activity of transcription factors and DNA target sequences may also affect the stability of mRNA expression levels of the selected reference gene, thus producing an erroneous quantification of the selected mRNA. This possibility leads to the

* Correspondence: elena.cattaneo@unimi.it

† Contributed equally

¹Department of Pharmacological Sciences and Center for Stem Cell Research, University of Milan, 9 Via Balzaretti, Milan, 20133, Italy

requirement of selecting many genes and extensive experimental work before choosing a panel of stable reference genes.

To avoid these problems, we propose a new strategy for mRNA normalization in RT-qPCR that is based on expressed Alu repeat (EAR) amplification as a measure for the total mRNA fraction. More than one million copies of the approximately 300-bp Alu element are interspersed throughout the human genome, with up to 75% of all known genes containing Alu insertions within their introns and/or untranslated regions (UTRs) [2]. Therefore, the differential expression of a number of genes in the tissues or cells under investigation will not influence EAR abundance in the transcriptome.

In this study, we set up a standardized RT-qPCR protocol for EAR amplification in the human transcriptome. We provide evidence that normalization based on EAR amplification is a suitable, fast, and precise tool for quantification of selected mRNA by RT-qPCR in human biological samples.

Results

There is a long-standing interest in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) because of its implications in neurodegenerative diseases [3]. BDNF is a neurotrophin that is crucial for the survival, maintenance, and differentiation of subpopulations of neurons in the central and peripheral nervous systems. Alterations in BDNF brain levels and activity have been described in various neurodegenerative disorders, most notably Huntington's disease (HD) [3]. Although BDNF is highly concentrated in the nervous system, it can also be detected in human blood and the blood of other mammals [4,5]. Because of that, several efforts have targeted testing BDNF levels in blood with the aim of assessing its potential value as a disease biomarker. For HD and other diseases, such as depression, schizophrenia, and Alzheimer's disease, its reliable detection in peripheral tissues may be crucial for understanding biological and pathogenic processes in humans and for assessing the potential activity of candidate therapeutic agents. Unfortunately, in human blood, this measurement has always proved problematic, especially for the BDNF protein. In fact, many factors influence this measurement, including the way the blood is collected, its storage, and the methodology employed to prepare the samples [6].

When considering the measurement of blood BDNF mRNA, recovery and storage of samples are less problematic because the PAXgene™ Blood RNA System (PreAnalytiX, QIAGEN, Hilden, Germany) allows stabilization of intracellular RNA without affecting RNA isolation and yield. Given the remarkable reduction in brain BDNF mRNA levels in HD, we set up a fast, accurate, and standardized method for BDNF mRNA detection in

blood. As for any other mRNA, this approach requires a normalization procedure that does not affect the experimental data. However, as Figure 1 shows, when the BDNF mRNA level in blood from eight control participants was normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA or β 2-microglobulin (β 2M) mRNA, the analyses produced different quantifications of BDNF mRNA levels normalized to these two different reference genes (median value BDNF mRNA/GAPDH mRNA, 1; median value BDNF mRNA/ β 2M mRNA, 1.6). These data support the notion that RT-qPCR performed with a conventional normalization strategy based on a single control gene may lead to erroneous quantification of target genes in human blood.

Set up of a new normalization strategy: EAR amplification

In the search for a stable tool for normalization, we focused on EARs because they are the most abundant repeats in the human genome. More than 1,500 human genes contain one or more Alu repeat in the UTRs regions. The EARs are about 280 nucleotides long and are divided into 30 well-conserved subfamilies (see [7] for a review). These features make EAR amplification a reliable tool for normalization in RT-qPCR based on the principle that the differential expression of a small number of genes bearing the EAR will not influence EAR abundance in the transcriptome. Figure 2a shows a BLAST representation of EAR element sequence conservation in the human genome. The small blue dots represent the position of EAR in the intergenic and intragenic regions and show that EARs are particularly located in the UTR and intronic regions. The Alu interspersed repetitive sequence and primers selected for the study are represented in Figure 2b while Additional file 1 shows the protocol for EAR amplification in the human transcriptome. As indicated, we first performed a retrotranscription (RT) reaction with total RNA at a final concentration of 12.5 ng/ μ l (see Materials and methods for additional details). The obtained cDNA was then diluted 1:200 and 5 μ l of this solution tested using RT-qPCR (see Materials and methods). Notably, another advantage of this assay is in the low amount of cDNA used for the analyses, allowing many experimental replicates when the starting material (RNA) is limiting. As Figure 2c shows, we obtained a good RT-qPCR outcome, as indicated by the PCR efficiency (102%) and correct slope value (-3.27). In addition, another important outcome arises from the analysis of the amplified products with the melting curve. As Figure 2d shows, multiple melting peaks emerge from these analyses, and the expected peaks by amplified products (88,69 T) can be recognized. This result is anticipated given that several peaks are generated by the polymorphisms present

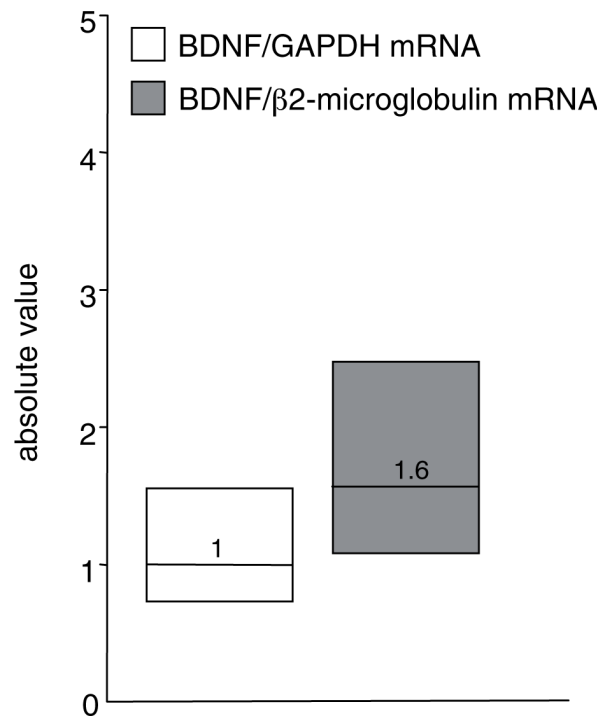


Figure 1 *BDNF* mRNA in human blood normalized to *GAPDH* and β 2M. Median *BDNF* mRNA levels in the blood of eight control participants from the Institute of Neurology, MRC Prion Unit, and University College London (UK). The *BDNF* level was determined by means of quantitative real-time PCR and normalized to the level of *GAPDH* mRNA and β 2M. The values are the averages of six independent PCR experiments. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile.

in the EAR sequences and by different Alu subfamilies [7]. We conclude that when working with EARs, different melting curves in different samples are to be expected and that for each sample the replicates have to share their melting curve.

Comparison of reference gene stability in human blood versus EARs

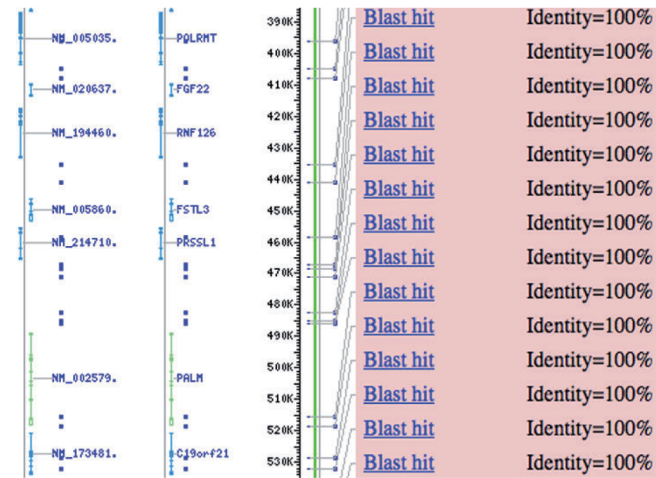
As indicated above, the use of NF obtained from the geometric mean of three or more stable reference genes is suitable for normalization [1]. We therefore decided to compare the EAR normalization tool to the normalization performed based on three more stable control genes expressed in blood and selected by the GeNorm algorithm. We started by choosing six different reference genes with expression in human blood that has been evaluated by RT-qPCR. The GeNorm algorithm was applied to calculate the M (see Table 1 for full gene name, accession number, chromosomal localization, indication that primers span an intron, and primer sequences). Genes with higher M values have greater variation in expression, and the threshold proposed for eliminating a gene as unstable was $M \geq 0.5$.

On the basis of our analyses, the ranking of the expression stability in these genes was (from most to

least stable): *GNB2L1* (guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1), *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), *YWHAZ* (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide), β 2M, *GAPDH*, and β ACT (β -actin) (Figure 3a). As shown, the M values of *GNB2L1*, *HPRT1*, and *YWHAZ* were lower than 0.5; therefore, these genes were concluded to be stably expressed reference genes in human blood. The NF value, used for normalization of RT-qPCR, was calculated based on the geometric mean of the expression levels of these three most stable control genes.

To assess the validity of EARs as a normalization tool versus the GeNorm strategy, we evaluated *BDNF* mRNA levels normalized to EARs and to NF in blood from ten healthy volunteers. Figure 3b shows that the quantification of *BDNF* mRNA in human blood is comparable after normalization with the two different strategies. The median value shown in Figure 3c confirms this result: the median values of blood *BDNF* mRNA levels normalized versus EARs and versus NF are similar to each other (0.95 versus 1.1), while the median value of *BDNF* mRNA normalized versus *GAPDH* mRNA is much lower (0.65). These data indicate that EARs represent a good tool for normalization and that

(a)

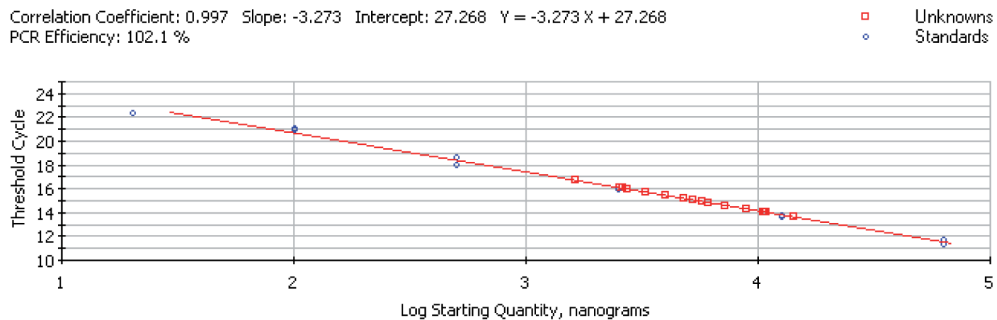


(b)

```

GGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACCTGAGGTCAGG
AGTTCGAGACCAGCCTGGCCAAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCGGTGGTGGC
CGGCCTGTAATCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGAGGCGGAGGTTGCAGTG
*****
AGCCGAGATCGGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAA
*****
    
```

(c)



(d)

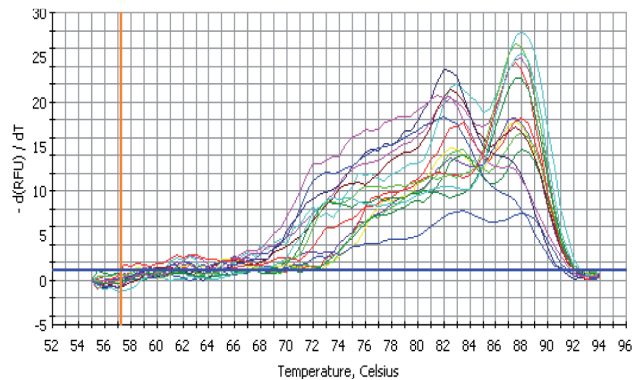


Figure 2 EAR amplification protocol in RNA from total blood. **(a)** BLAST analysis for Alu repeat distribution in the human genome. Alu repeat sequences are present in the UTRs of many genes. The small blue points indicate the homologous sequences at the Alu human consensus repeat. **(b)** Alu human interspersed repetitive sequence and primers used in this study for EAR amplification. **(c)** C_q of EAR mRNA plotted against the log of the relative initial amount of the pooled cDNA. **(d)** Melt-curve diagram generated from the amplification as described in (c).

Table 1 Primers sequences for GeNorm

| Symbol | Name | NCBI accession number | Localization | Span intro | Sequences |
|---------------|--|-----------------------|---------------|------------|--|
| <i>ACTB</i> | Beta actin | NC_001101 | Chromosome 7 | No | Fw:5'-AGTGTGACGTGGACATCCGCA-3' Rev:5'-GCCAGGGCAGTGATCTCCTTCT-3' |
| <i>HPRT1</i> | Hypoxanthine purine synthesis phosphoribosyl-transferase 1 | NC_000023.9 | Chromosome x | Yes | Fw:5'-ATGACCAGTCAACAGGGGACAT-3' Rev: 5'-CAACACTTCGTGGGGTCCTTTTCA-3' |
| <i>YWHAZ</i> | Tyrosine 3-monooxygenase/S tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide | NC_000008.9 | Chromosome 8 | Yes | Fw: 5'-CGTTACTTGGCTGAGGTTGCC-3' Rev: 5'-GTATGCTTGTGTGACTGATCGAC-3' |
| <i>GNB2L1</i> | Guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2-like 1 | NC_000005.8 | Chromosome 5 | Yes | Fw: 5'-GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG-3' Rev: 5'-GCTTGCAGTTAGCCAGGTTCC-3' |
| <i>B2M</i> | Beta-2-microglobulin | NC_000015.8 | Chromosome 15 | No | Fw: 5'-GGAGAGAGAATTGAAAAAGTGAGC-3' Rev: 5'-GGCTGTGACAAAGTCACATGGTT-3' |
| <i>GAPDH</i> | Glyceraldehyde-3-oxidoreductase phosphate dehydrogenase | NC_000012.10 | Chromosome 12 | No | Fw: 5'-AGCTGAACGGGAAGCTCACT-3' Rev: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTTG-3' |

normalization over a single reference gene provides incorrect results.

Subsequently, we applied the EAR normalization tool for the quantification of *BDNF* mRNA in the eight control participants analyzed in Figure 1, in which the messenger level of the neurotrophin is represented relative to *GAPDH* or *β 2M* mRNA content. Figure 3d shows the median value of *BDNF* mRNA normalized over *GAPDH* (1), *β 2M* (1.6), or EARs (0.55). As shown, the distribution of the *BDNF* mRNA values normalized to EARs is tighter with respect to the distribution of *BDNF* mRNA normalized to *GAPDH* or *β 2M* mRNA, indicating that the EAR normalization strategy removes most of the non-specific variations arising from the use of an inappropriate internal reference gene.

The experiments described above prove the reliability of the EAR normalization strategy with respect to GeNorm as well as the efficiency of this new method with respect to normalization to a single housekeeping gene to measure *BDNF* mRNA levels in human blood.

EAR normalization applies to the quantification of mRNAs specifically expressed in blood

To evaluate the reliability of the EAR normalization strategy with other, more blood-specific genes, we analyzed *IL8* (interleukin-8) mRNA levels in blood from control participants. Validation of EAR normalization for cytokine quantification in blood might be particularly useful

for measuring the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic inflammatory disorders or autoimmune disease. Cytokine mRNA quantification is therefore of clinical relevance to immuno-monitoring and for the evaluation of the disease status in patients.

In our measurements of *IL8* mRNA levels in ten control participants, normalized versus EARs and versus NF, the *IL8* mRNA levels with the two different approaches were similar in single human samples; also, again, the similar median value obtained (Figure 4b) confirmed the result.

We concluded that EARs are a suitable normalization tool for gene expression study of cytokines in human blood.

EAR normalization for human tissues other than blood

Fast, sensitive, and accurate quantification in RT-qPCR analysis is a crucial tool not only for assessing mRNA in human blood but also for evaluating the levels of given molecules in tissues such as post-mortem human brain. In a previous study, we analyzed *BDNF* mRNA levels in 38 post-mortem human cortices from control participants and HD patients using *GAPDH* as the reference gene [8]. The *GAPDH* gene is, in fact, one of the more commonly used reference genes in such analyses [9].

Here we tested whether *GAPDH* is a stable control gene for brain tissues versus EAR and whether normalization over EAR still confirms the finding of a robust

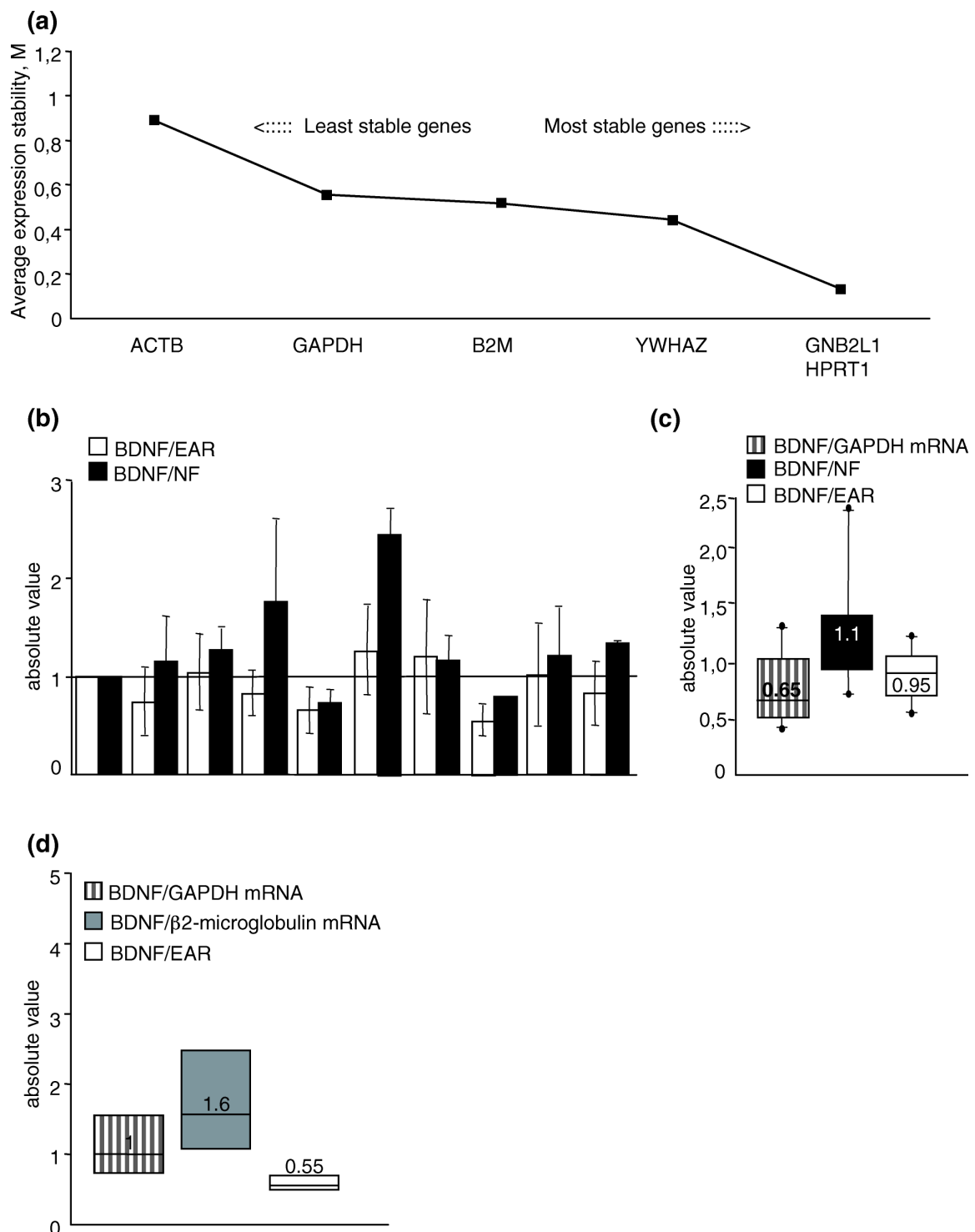
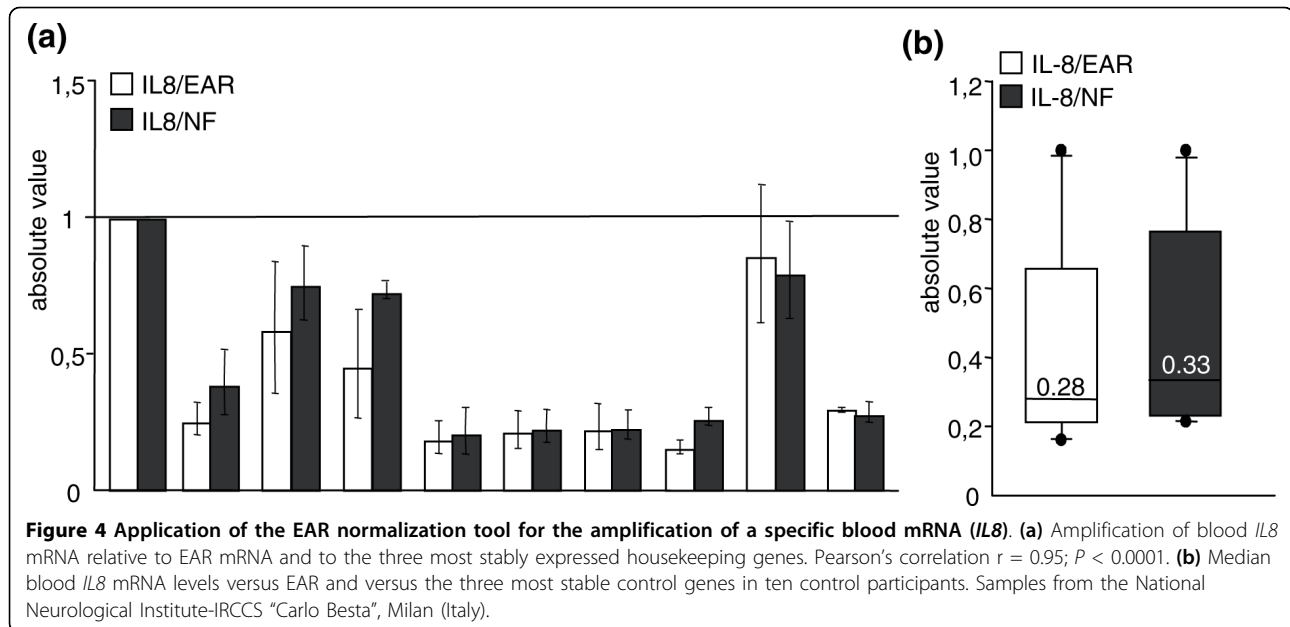


Figure 3 Validation of EAR as a tool for normalization in RT-qPCR. (a) Application of the GeNorm algorithm to eight genes to identify the three most stable housekeeping genes in blood. Average expression stability values (M) of remaining control genes during stepwise exclusion of the least stable control gene in the human blood of eight control participants. **(b)** Blood *BDNF* mRNA relative to EAR and to the three most stably expressed housekeeping genes. Pearson's correlation $r = 0.56$; $P < 0.05$. **(c)** Median blood *BDNF* mRNA levels versus *GAPDH*, versus the three most stable control genes and versus EAR in ten control participants. Samples used in (a-c) were from the National Neurological Institute-IRCCS "Carlo Besta", Milan (Italy). **(d)** Median blood *BDNF* mRNA levels versus *GAPDH*, versus β 2M, and versus EAR mRNA in eight control participants from the Institute of Neurology, MRC Prion Unit, University College London (UK).



reduction in *BDNF* mRNA in HD cortical samples over controls [8]. To evaluate the efficiency of *GAPDH*, we used the same RNA as in Zuccato *et al.* [8] and performed a GeNorm analysis on six different reference genes. As shown in Figure 5a, the ranking of the expression stability in these genes was (from most to least stable): *GAPDH*, *YWHAZ*, β *ACT*, β *2M*, *HPRT1*, and *GNB2L1*. The M values of *GAPDH* were lower than 0.5, confirming that this gene is a stably expressed reference gene in human cortex and also validating the previously performed quantification of the *BDNF* mRNA in human HD samples versus controls [8]. Using the same RNA, we next repeated the analysis of *BDNF* mRNA levels and used normalization to EARs or to *GAPDH*. Figure 5b shows that the *BDNF* mRNA level was lower in HD patients with respect to control participants (Mann-Whitney, $P < 0.05$, two-tailed test). These data demonstrate the efficiency of EAR normalization for quantifying a transcript of interest in other human tissues, such as cerebral cortex, that are normally subjected to a long post-mortem delay.

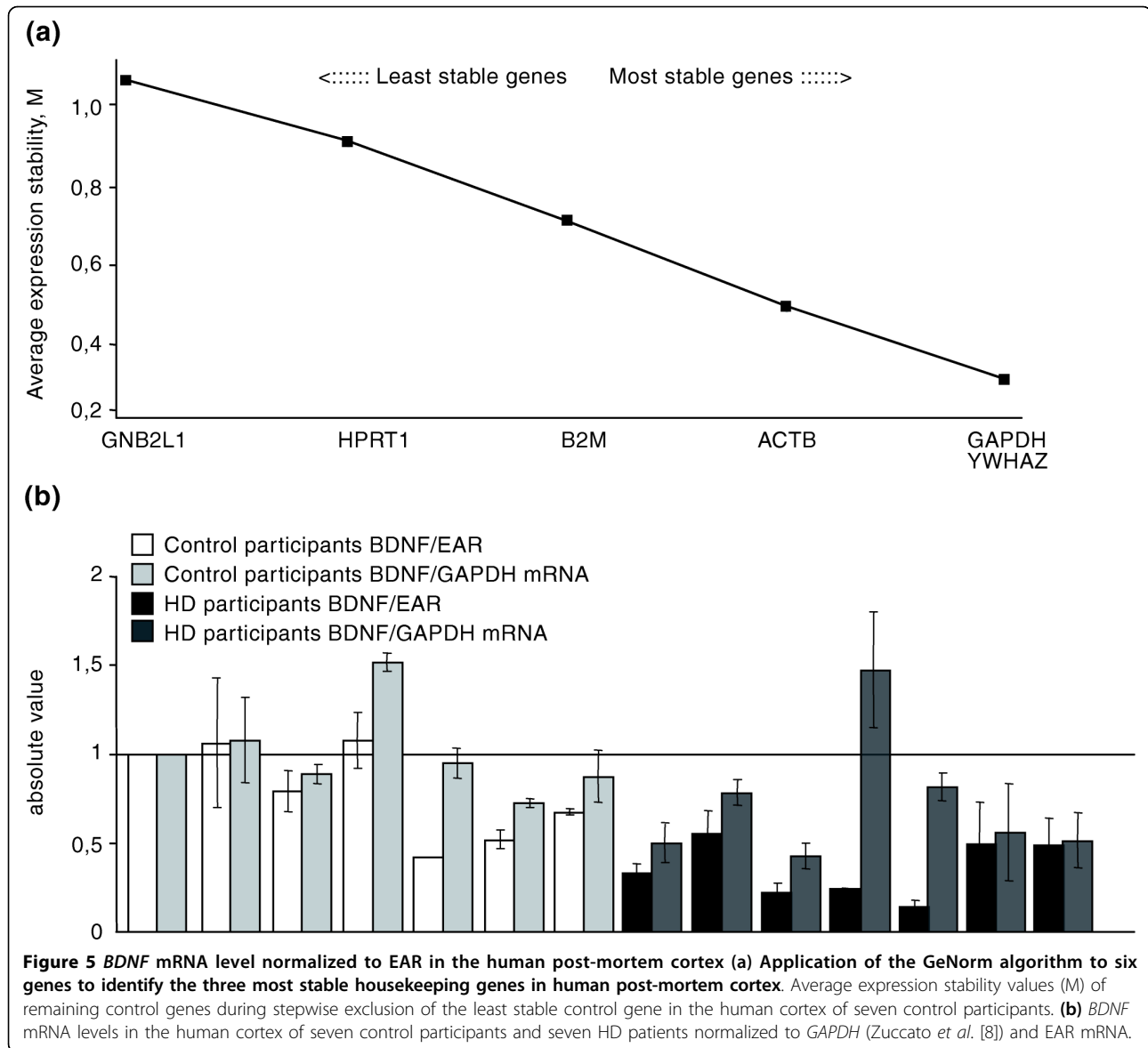
Moreover, we extended the application of EAR normalization strategy to samples from skeletal muscle, an accessible tissue that responds to hormonal, metabolic and neural inputs. The muscle, therefore, is a reasonable tissue to examine for gene expression changes that might be turned into biomarkers for neurodegenerative diseases [10]. In particular, we have analyzed the expression levels of *TNNIC* (troponin C type 1) mRNA, a stable gene expressed in the skeletal muscle. The GeNorm algorithm was applied to evaluate three more stable control genes expressed in human muscle. On the basis

of our analyses, the ranking of the expression stability in these genes was (from most to least stable): *GNB2L1*, *HPRT1*, *YWHAZ*, β *2M*, *GAPDH*, and β *ACT* (Figure 6a). As shown, the M values of *GNB2L1*, *HPRT1*, and *YWHAZ* were lower than 0.5; therefore, these genes were concluded to be stably expressed reference genes in human skeletal muscle. The NF value, used for normalization of RT-qPCR, was calculated based on the geometric mean of the expression levels of these three most stable control genes. Importantly, in our measurements of *TNNIC* mRNA levels in four control participants, normalized versus EARs and versus NF, the *TNNIC* mRNA levels with the two different approaches were overlapping in single human samples. Figure 6b also shows a similar median value between the two measurements.

The data described above show that, in addition to peripheral blood, the EAR normalization strategy can be applied to samples from human brain and skeletal muscle, implying that this method could be used for assessing different human samples.

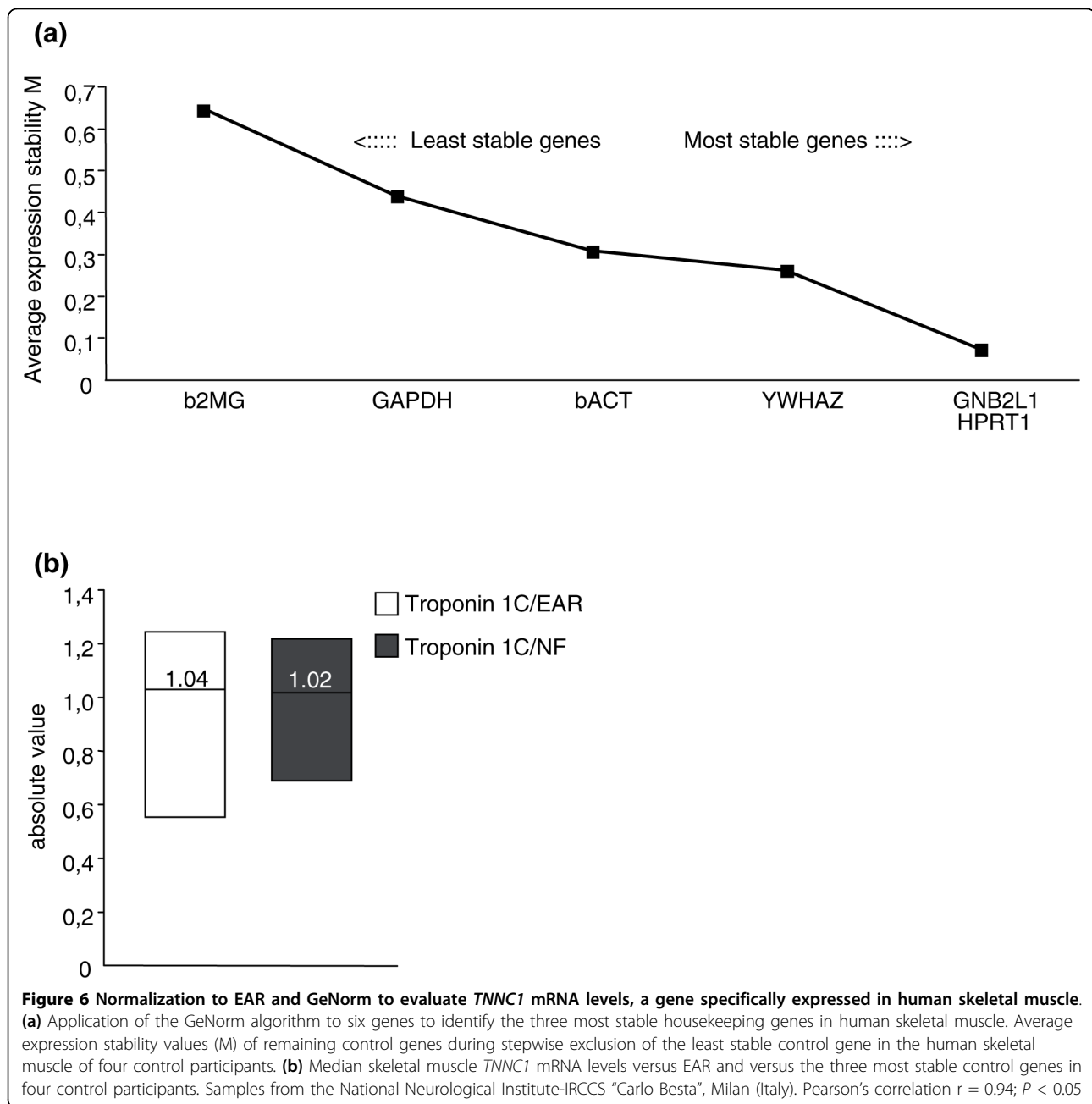
Discussion

Accurate normalization of mRNA levels is an absolute prerequisite for obtaining reliable results in gene expression studies. Recently, considerable attention has focused on the systematic study of normalization procedures. Up to the year 2000, a number of articles discussed the problem of normalizing mRNA values over a reference gene, indicating that the most commonly used reference genes, such as *GAPDH* and β *ACT*, exhibit variation under different experimental conditions



[9,11,12]. In addition, finding suitable reference genes is not straightforward, and different internal control genes should be tested in the context of a specific experimental design. Different groups have faced this problem [13,14], and interesting strategies have been proposed. In particular, Vandesompele *et al.* [1] elucidated the errors related to the common practice of single control normalization. The results showed that a conventional normalization strategy based on a single reference gene leads to erroneous normalization and also demonstrated that ideal and universal control genes do not exist. A proposed alternative strategy is based on a gene stability measure (M) as the average pair-wise variation between a particular gene and all other control genes. This approach has led to the

GeNorm algorithm, which evaluates the M of common reference genes and allows determination of the most stably expressed genes in the tissue analyzed during stepwise exclusion of the worst scoring gene points [1]. The rationale for this analysis is that a normalization factor based on proper internal control genes should remove all non-specific variation. This robust procedure has led to more accurate gene expression studies; however, the method must be set up for different tissues analyzed and requires a high number of replicates, involving extensive experimental work and twice the amount of sample material. Despite being an important development, the GeNorm strategy does not completely satisfy the need for a universal method for normalization in RT-qPCR.



We therefore focused on the EARs. The location of EARs in UTRs of 1,500 genes makes the development of this novel strategy an important tool for normalization. In fact, even the transcriptional dysregulation that characterizes several pathological conditions does not significantly alter the total amount of EARs in the whole human transcriptome. This scenario applies in HD, in which the activity of several transcription factors and related DNA target sequences is impaired [15], thus specifically complicating the choice of a suitably stable reference gene both in the control and HD population.

One of the selected mRNA targets in this study, *BDNF*, is reported to be involved in the pathogenesis of HD [3,16]. Previous studies have shown that *BDNF* mRNA is consistently reduced in cells and *in vivo* brain tissues from HD transgenic mice and patients [3]. In addition, blood *BDNF* levels correlate with brain *BDNF* levels and disease progression in HD mice [17]. The protocol described here for the rapid and accurate evaluation of *BDNF* mRNA in human blood samples represents a step forward in efforts to develop a reliable measurement of key mRNA in blood. Moreover, we

clearly demonstrated that mRNA levels normalized over EARs are comparable to those obtained after normalization using the most robust normalization strategies available in both analyzed tissues.

More important, given the widespread distribution of EARs in the human genome and the absence of any tissue specificity in their expression, the EAR normalization tool described here can be universally applied to human biological samples (blood, skeletal muscle and post-mortem brain tissues), avoiding the time-consuming and expensive experimental work needed for selection and analysis of the most stable reference genes in the chosen tissue. It should be noted that the EAR normalization strategy minimizes the amount of RNA used for the analysis, an important advantage for expression studies on samples characterized by a limited amount of RNA where it would otherwise be very difficult to use alternative methods such as GeNorm.

Conclusions

A reliable and flexible normalization strategy has been an urgent need in the context of gene expression studies in human samples. We have identified a suitable novel normalization strategy that can be applied in different types of human biological material. EAR normalization enables the validation of an appropriate control gene for any specific experimental design to be avoided. More important, the strategy of reducing non-specific variation in samples by normalizing to EAR enables a straightforward assessment of relevant biological variation from mRNA levels. This possibility is particularly important in the context of clinical studies for evaluating the alteration of mRNA levels as reliable markers of disease progression.

Materials and methods

Recruitment of healthy volunteers

Individuals were recruited for the study from the National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London (UK) and the National Neurological Institute-IRCCS "Carlo Besta", Milan (Italy). Full ethical review and consent was obtained for the research use of blood and skeletal muscle from healthy volunteers and all subjects gave informed written consent. Table 2 gives participant demographic characteristics.

Human tissue collection

Blood collection

A total of 2.5 ml whole venous blood was collected in an evacuated blood collection tube (PAXgene™ Blood RNA Tube, BD Vacutainer™, Plymouth, UK) containing a stabilizing additive. After sample collection, the PAX tubes were incubated and stabilized at room temperature for 2 hours, followed by immediate storage at -20°C until RNA extraction.

Table 2 Characteristics of the study

| | Number | Gender (F/M) | Age (years) |
|---------------------------------------|--------|--------------|-------------|
| Blood | | | |
| University College London (UK) | 8 | 4/4 | 44 (28-62) |
| Institute-IRCCS "Carlo Besta" (Italy) | 10 | 7/3 | 31 (23-45) |
| Skeletal muscle | | | |
| Institute-IRCCS "Carlo Besta" (Italy) | 4 | 2/2 | 35 (24-46) |

F: female; M: male

Skeletal muscle collection

Biopsies of vastus lateralis muscle were obtained after informed consent from National Neurological Institute-IRCCS "Carlo Besta" (Italy). Biopsies were obtained under local anesthesia and immediately frozen in dry ice or liquid nitrogen.

RNA extraction

RNA was extracted from whole blood using the PAXgene™ Blood RNA System Kit (PreAnalytiX, QIAGEN) following the manufacturer's guidelines. Total RNA concentration and purity were measured using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and quality was verified by means of agarose gel electrophoresis of 1 µg of each sample (Additional data file 2). The total RNA was stored in aliquots at -80°C.

The muscle samples were homogenized in TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using a Ultraturax homogeniser. Total RNA was isolated according to the manufacturer's protocol and stored in aliquots at -80°C.

RNA retrotranscription

Using Superscript III RNaseH reverse transcriptase (Invitrogen) and random primers in a volume of 20 µl, 250 ng total RNA was reverse-transcribed to single-stranded cDNA, according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR

Three independent PCR analyses were performed of each of two independent RT reactions, for a total of six independent measurements for each of the analyzed mRNA samples.

BDNF, IL8, TNNC1 and housekeeping genes

Using an iCycler Thermal Cycler with a Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), all of the reactions were performed in a total volume of 25 µl containing 5 µl of cDNA from a 1:10 RT dilution, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM dNTPs, iTaq DNA polymerase, 25 units/ml, 3 mM

MgCl₂, SYBR Green I, 10 nM fluorescein, stabilizers (iQTM SYBR Green Supermix, Bio-Rad), and 0.3 μM of forward and reverse primers. The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 95°C for 3 minutes, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C. Fluorescence was quantified during the 60°C annealing step, and product formation was confirmed by means of a melting curve analysis (55 to 94°C). The amounts of *BDNF* and *IL8* mRNA were normalized to the geometric mean of the three most stable housekeeping genes (*HPRT1*, *YWHAZ*, and *GNB2L*; Table 1 for primer sequences).

The *BDNF*-specific primers set up on the *BDNF* coding sequence (GenBank accession number AF411339) were *BDNF* 5'-TAACGGCGGCAGACAAAAGA-3' and *BDNF* 5'-GAAGTATTGCTTCAGTTGGCCT-3'. The obtained amplification product was 101 bp long. The *IL8*-specific primers were set up referring to GenBank accession number NM_000584.2; the primer sequences were *IL8* 5'-CCATCTCACTGTGTGTAACATGAC-3' and *IL8* 5'-TCCACTCTCAATCACTCTCAGTTCT-3'. The obtained amplification product was 194 bp long. The *TNNC1*-specific primers were set up referring to GenBank accession number NM_003280.2; the primer sequences were *TNNC1* 5'-TGCAGGAGATGATCGATGAGGTG-3' and *TNNC1* 5'-TGCGGAA-GAGGTCAGACAGCTC-3'. The obtained amplification product was 138 bp long.

EARs

Using an iCycler Thermal Cycler with a Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio-Rad), all of the reactions were performed in a total volume of 25 μl containing 5 μl of cDNA from a 1:200 RT dilution, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM dNTPs, iTaq DNA polymerase, 25 units/ml, 3 mM MgCl₂, SYBR Green I, 10 nM fluorescein, stabilizers (iQTM SYBR Green Supermix, Bio-Rad), and 0.3 μM of forward and reverse primers. The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 95°C for 3 minutes, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C. Fluorescence was quantified during the 60°C annealing step, and product formation was confirmed by means of a melting curve analysis (55 to 94°C).

The EAR-specific primers were set up on an Alu human interspersed repetitive sequence (Figure 2b). The primer sequences were EAR 5'-GAGGCTGAGGCAG-GAGAATCG-3' and EAR 5'-GTCGCCAGGCTG-GAGTG-3'. The obtained amplification product was 87 bp long.

Statistical analyses and data representation

Because *BDNF* values did not have a normal distribution, the non-parametric Mann-Whitney two-tailed U-test was used for the statistical analyses, with significance set at

$P < 0.05$. Median values were chosen because of the skewed distribution of the data. In each figure, the boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median or 50th percentile, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When ten or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles.

The validation of the EAR normalization strategy with respect to the GeNorm algorithm was measured using Pearson correlations (r).

The materials and methods section and nomenclature follows the MIQE reporting guidelines [18].

Additional file 1: Protocol for EAR amplification in the human transcriptome

Protocol for EAR amplification in the human transcriptome.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/gb-2010-11-1-r9-S1.pdf>]

Additional file 2: A selection of RNA from peripheral blood used in this study

A selection of RNA from peripheral blood used in this study.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/gb-2010-11-1-r9-S2.pdf>]

Abbreviations

β2M: β2-microglobulin; βACT: β-actin; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; EAR: expressed Alu repeat; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GNB2L1: guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1; HD: Huntington's disease; HPRT1: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IL: interleukin; M: gene expression stability measure; NF: normalization factor; RT: retrotranscription; RT-qPCR: real-time quantitative RT-PCR; TNNC1: troponin C type 1; UTR: untranslated region; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Marco Bianchi from Bio-Rad Laboratories (Segrate, MI, Italy) for technical advice and for helpful comments on the manuscript. This work was supported by NeuroNe (sixth Framework Programme, European Union, LSHM-CT-2004-512039) and Stem-HD (Framework Programme, Union, LSHB-CT-2006-037349) (E Cattaneo). This paper and protocol was developed based on an original idea and proof of concept of the method presented by J Vandesompele at the 2nd International qPCR Symposium, Freising-Weihenstephan, Germany, September 6, 2005.

Author details

¹Department of Pharmacological Sciences and Center for Stem Cell Research, University of Milan, 9 Via Balzaretto, Milan, 20133, Italy. ²Division of Biochemistry and Genetics, National Neurological Institute-IRCCS "Carlo Besta", 11 Via Celoria, Milan, 20133, Italy. ³Department of Neurodegenerative Disease, UCL Institute of Neurology University College London and National Hospital for Neurology and Neurosurgery, Queen Square, London, WC1N 3BG, UK.

Authors' contributions

MM, CZ, and EC conceived the project and wrote the manuscript. MM carried out the molecular biology experiments. MM, CZ, and EC have evaluated the results and interpreted the data. CM, SD, NL and ST provided blood samples for the analyses and evaluated the data. All authors approved the final manuscript.

Received: 28 July 2009 Revised: 5 January 2010

Accepted: 28 January 2010 Published: 28 January 2010

References

1. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**:RESEARCH0034.1-RESEARCH0034.11.
2. Yulug IG, Yulug A, Fisher EM: **The frequency and position of Alu repeats in cDNAs, as determined by database searching.** *Genomics* 1995, **27**:544-548.
3. Zuccato C, Cattaneo E: **Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases.** *Nat Rev Neurol* 2009, **5**:311-322.
4. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN: **Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation.** *Thromb Haemost* 2002, **87**:728-734.
5. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA: **Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay.** *Brain Res* 1996, **709**:122-130.
6. Trajkovska V, Marcussen AB, Vinberg M, Hartvig P, Aznar S, Knudsen GM: **Measurements of brain-derived neurotrophic factor: methodological aspects and demographical data.** *Brain Res Bull* 2007, **73**:143-149.
7. Batzer MA, Deininger PL: **Alu repeats and human genomic diversity.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**:370-379.
8. Zuccato C, Marullo M, Conforti P, MacDonald ME, Tartari M, Cattaneo E: **Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease.** *Brain Pathol* 2008, **18**:225-238.
9. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR: **Control selection for RNA quantitation.** *Biotechniques* 2000, **29**:332-337.
10. Strand AD, Aragaki AK, Shaw D, Bird T, Holton J, Turner C, Tapscott SJ, Tabrizi SJ, Schapira AH, Kooperberg C, Olson JM: **Gene expression in Huntington's disease skeletal muscle: a potential biomarker.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**:1863-1876.
11. Bustin SA: **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol* 2000, **25**:169-193.
12. Bustin SA: **Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.** *J Mol Endocrinol* 2002, **29**:23-39.
13. Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C: **The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression.** *J Biomol Tech* 2003, **14**:33-43.
14. Pachot A, Blond JL, Mouglin B, Miossec P: **Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood.** *J Biotechnol* 2004, **114**:121-124.
15. Cha JH: **Transcriptional signatures in Huntington's disease.** *Prog Neurobiol* 2007, **83**:228-248.
16. Zuccato C, Cattaneo E: **Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease.** *Prog Neurobiol* 2007, **81**:294-330.
17. Conforti P, Ramos C, Apostol BL, Simmons DA, Nguyen HP, Riess O, Thompson LM, Zuccato C, Cattaneo E: **Blood level of brain-derived neurotrophic factor mRNA is progressively reduced in rodent models of Huntington's disease: restoration by the neuroprotective compound CEP-1347.** *Mol Cell Neurosci* 2008, **39**:1-7.
18. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT: **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clin Chem* 2009, **55**:611-622.

doi:10.1186/gb-2010-11-1-r9

Cite this article as: Marullo *et al.*: Expressed Alu repeats as a novel, reliable tool for normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *Genome Biology* 2010 **11**:R9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Analysis of the Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor/Neuron-Restrictive Silencer Factor Occupancy of Non-Neuronal Genes in Peripheral Lymphocytes from Patients with Huntington's Disease

Manuela Marullo¹; Marta Valenza¹; Caterina Mariotti²; Stefano Di Donato²; Elena Cattaneo^{1*}; Chiara Zuccato^{1*}

¹ Department of Pharmacological Sciences and Center for Stem Cell Research, University of Milan, Milan, Italy.

² Division of Biochemistry and Genetics, National Neurological Institute—IRCCS “Carlo Besta”, Via Celoria 11, Milan, Italy.

Keywords

Huntington, Lymphocytes, REST/NRSF.

Corresponding author:

Elena Cattaneo, PhD, Department of Pharmacological Sciences and Center for Stem Cell Research, University of Milan, Via Balzaretti 9, 20133 Milan, Italy (E-mail: elena.cattaneo@unimi.it)

Received 8 August 2008; accepted 15 October 2008.

* co-last authors

doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00249.x

Abstract

We have previously demonstrated that the transcription of neuronal repressor element-1/neuron-restrictive silencer element (RE1/NRSE)-regulated genes is reduced in the brain of subjects with Huntington's disease (HD) as a result of increased binding of the repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) to its RE1/NRSE targets. As specific non-neuronal REST/NRSF-regulated genes have been identified in the human genome, we exploited the possibility that the binding of REST/NRSF to its target RE1/NRSE sites may also be altered in the peripheral tissues of HD patients.

Our results show that REST/NRSF occupancy is increased in lymphocytes from HD subjects, thus indicating for the first time that the activity of the RE1/NRSE sites is dysfunctional *in vivo*. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of the RE1/NRSE sites in lymphocytes may therefore be a reproducible, sensitive and specific means of searching for candidate markers of HD onset and progression.

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is a dominantly inherited and progressive neurodegenerative disorder that is characterized by the loss of neurons in the striatum and cerebral cortex and leads to motor impairment and cognitive decline (15). The disease-triggering event is an abnormal expansion of a CAG triplet repeat in the 5' end of the gene encoding for the huntingtin protein (18) and, as a consequence of the elongated polyglutamine (polyQ) stretch, huntingtin loses some of its beneficial activities and becomes toxic to brain neurons (6).

A number of studies have shown that transcriptional dysregulation is a central pathogenic mechanism in HD (8). The expression of many transcripts is altered in the brain of HD patients by mutant huntingtin's ability to affect transcription factor activity, DNA target sequences and chromatin remodeling (8). The affected transcriptional pathways include the repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF), a repressor that controls the expression of neuronal genes by binding to its target sequence repressor element-1/neuron-restrictive silencer element (RE1/NRSE). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments performed on HD cells, HD mouse brain and post-mortem brain samples from subjects affected by HD

have revealed increased binding of REST/NRSF to its regulatory motif RE1/NRSE, and we have reported that the expression of a number of RE1/NRSE-regulated neuronal genes, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), is greatly reduced in HD (20, 21).

In this study, we sought *in vivo* proof of the aberrant occupancy of RE1/NRSE sites in human HD, concentrating on the RE1/NRSE sites localized in the small number of genes encoding non-neuronal proteins expressed in human peripheral cells (11). In a preliminary experiments, we found that REST/NRSF occupancy is increased at the RE1/NRSE site within the hepatic transcription factor HNF-1a locus of livers from HD but not in control mice (21), which suggested searching for RE1/NRSE-regulated genes actively transcribed in human peripheral cells in order to verify whether REST/NRSF occupancy of these loci reflects the pathological genomic profile observed in the brain. In addition, this might be useful for evaluating various aspects of disease progression and pharmacological treatment.

Using ChIP experiments with fresh lymphocytes from peripheral blood, we found that REST/NRSF occupancy of RE1/NRSE loci in the proximity of the *leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor, subfamily B, member 4 (LILRB4)* and *Ig lambda-like polypeptide 1 precursor (IGLL1)* genes was higher in chromatin

from HD patients ($n = 31$) than in controls ($n = 17$). No alteration was found in pre-HD gene carriers ($n = 5$). We also found that increased REST/NRSF occupancy is a specific molecular phenotype caused by the polyQ expansion in huntingtin protein as controls and patients with spinocerebellar ataxia type 1, 2 and 6 (SCA1, SCA2 and SCA6) patients ($n = 7$) had overlapping REST/NRSF occupancy profiles.

Our results indicate that peripheral lymphocytes from HD patients show increased binding of REST/NRSF to RE1/NRSE loci, thus mirroring a pathological event occurring in the nervous system. Given the precise molecular window in gene transcription assessed by ChIP of the RE1/NRSE sites, our data suggest that ChIP analysis of the RE1/NRSE sites in lymphocytes can be used as a novel, reproducible, sensitive and specific means of assessing the activity of candidate therapeutic agents capable of restoring the transcription of RE1/NRSE-controlled neuronal genes in the brain.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The patients were enrolled, and the molecular, genetic and clinical evaluations were made in collaboration with C. Besta National Neurological Institute (Milan, Italy) in accordance with the 1994 guidelines of the International Huntington's Association and World Federation of Neurology Research Group for HD. All of the eligible participants received verbal and written information about the study, and signed an informed consent form (informed consent was obtained from the relatives of symptomatic HD patients with severe cognitive impairment).

The 60 enrolled subjects included 31 patients with symptomatic HD (grades 1, 2, 3 and 4) and positive genetic tests for the presence of the pathogenic triplet repeat expansion; five presymptomatic HD subjects with a positive family history of HD, but no clinical signs of the disease; seven patients with SCA type 1, 2 and 6; and 17 controls recruited from patients, healthy relatives and spouses. Table 1 shows the subjects' gender, age, disease duration, total function capacity score (TFC), Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS) motor score and the length of the CAG repeat on the expanded allele.

Lymphocyte and monocyte isolation and culturing conditions

Blood samples (30 mL) were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated tubes (K3 EDTA 15%, Vacutainer® blood collection tubes, Franklin Lakes, NJ, USA), and processed 2 h later under sterile conditions after being diluted with an equal volume of phosphate-buffered saline (PBS). Lympholyte Mammal (Tebu-Bio, Yvelines, France) was used for the high-yield and non-selective recovery of viable lymphocytes and monocytes as instructed by the manufacturer, and 30×10^6 cells were cultured overnight at 37°C in T-75 flasks in the presence of Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum to allow the monocytes to adhere. The non-adherent cells (the lymphocyte population) were collected and centrifuged for 10 minutes at $800 \times g$.

Cytofluorimetric analysis

Five thousand cells were treated with 1% formaldehyde in PBS and cytofluorimetrically analysed using a Cytomics™ FC 500 Flow Cytometry System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and software for data collection; the acquisition process was stopped after 10,000 total events.

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA was digested with DNA-free (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 37°C for 10 minutes. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed to single-stranded cDNA using Superscript III RNaseH reverse transcriptase (Invitrogen) and random primers in a volume of 20 µL as instructed by the manufacturer.

Qualitative polymerase chain reaction (PCR)

PCR was performed in a total volume of 50 µL containing cDNA made from 0.20 µg of RNA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM of each primer, and 2 U

Table 1. Clinical and genetic characteristics of HD, pre-HD, SCA and healthy patients, expressed as median values (min-max). Abbreviations: HD = Huntington's disease; SCA = spinocerebellar ataxia; TFC = total function capacity score; UHDRS = Unified Huntington's Disease Rating Scale.

| | HD (n = 31) | Pre-HD (n = 5) | SCA type 1, 2 and 6 (n = 7) | Controls (n = 17) |
|--------------------------|---|----------------|-----------------------------|-------------------|
| Clinical characteristics | | | | |
| Women-men | 11-20 | 2-3 | 5-2 | 10-7 |
| Age (years) | 53.5 (30-81) | 36 (36-47) | 46 (26-69) | 53 (27-71) |
| Disease duration (years) | 6 (1-12) | — | 12 (5-19) | — |
| UHDRS motor score | 24 (1-77) | 0 (0-6) | — | — |
| TFC | 10.5 (1-13) | 13 (13-13) | — | — |
| Disease stages | Stage I = 16 Stage II = 7 Stage III = 7 Stage IV = 1 | — | — | — |
| Genetic characteristics | | | | |
| CAG repeats normal | 17 (15-24) | 20 (17-22) | 22 (11-29) | — |
| CAG repeats expanded | 44 (40-52) | 40 (39-43) | 47 (22-53) | — |

Taq polymerase (Invitrogen). BDNF IIA, IIB and IIC were amplified by means of amplification cycles consisting of an initial denaturing cycle at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 1 minutes at 94°C, 45 s at 62°C and 45 s at 72°C. *LILRB4* was amplified by means of a PCR protocol consisting of an initial denaturing cycle at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. For *IGLL1* mRNA detection, the PCR protocol consisted of an initial denaturing cycle at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. The following primers were used:

- BDNF II: 5'-GGGCGATAGGAGTCCATTCCAGCAC-3'; and
- BDNF XIII (set up on BDNF coding region): 5'-CCAAGCCACCTTGTCTCCGATG-3'.

The sizes of the BDNF IIA, IIB and IIC amplification products were, respectively, 483, 400 and 185 bp.

- *LILRB4* Fw: 5'-GCTGCCGTGAAGAACACACAG-3'; and
- *LILRB4* Rev: 5'-AGTGTCCATCTGTCTGTCCTCT-3'.

The size of the amplification product was 207 bp.

- *IGLL1* Fw: 5'-ACAGCTGCATCGCAGAGCA-3'; and
- *IGLL1* Rev: 5'-TTGAGCTCCTCAGAGGACG-3'.

The size of the amplification product was 142 bp.

The same amount of each cDNA was also independently amplified with specific primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA. The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C.

The primer sequences for the amplification of GAPDH were:

- GAPDH Fw: 5'-AGCTGAACGGGAAGCTCACT-3'; and
- GAPDH Rev: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTTG-3'.

The size of the amplified product was 67 bp.

The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis.

Real-time PCR for REST mRNA level

Using an iCycler Thermal Cycler with a Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), the PCRs were performed in a total volume of 25 μ L containing 5 ng of cDNA, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM dNTPs, 25 U/mL iTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR Green I, 10 nM fluorescein, stabilisers (iQ SYBR Green Supermix; Bio-Rad) and 0.2 μ M of forward and reverse primers. The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 95°C for 3 minutes, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Fluorescence was quantified during the 60°C annealing step, and product formation was confirmed by melting curve analysis (55–94°C). The amounts of the target gene mRNA were normalized to a reference gene (GAPDH) according to Pfaffl (2001). The primer sequences were:

- REST Fw: 5'-ACTTTGTCCTTACTCAAGTTCTCAG-3'; and
- REST Rev: 5'-ATGGCGGGTTACTTTCATGTT-3'.

The size of the amplified product was 130 bp.

- GAPDH Fw: 5'-AGCTGAACGGGAAGCTCACT-3'; and
- GAPDH Rev: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTTG-3'.

The size of the amplified product was 67 bp.

Chromatin immunoprecipitation

The lymphocytes (70×10^6) were washed three times with PBS and treated with 1% formaldehyde in PBS by rotation for 8 to 10

minutes at 4°C. Fixation was stopped by adding glycine to a final concentration of 125 mM. The cells were washed twice with PBS, and the pellets were suspended in 300 μ L of CHIP lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and the MINI protease inhibitor mixture (Roche, Basel, Switzerland) with 1% SDS (final concentration), and passed through 25–21 ga needles. An additional 2.7 mL of lysis buffer without SDS was added to each sample before sonication. The cell and tissue extract was sonicated five times with 30 s pulses using the microprobe at 40% to 50% output and a 70% duty cycle in glass tubes in order to minimize foaming, and, under these conditions, DNA fragments with an average size of 200–700 bp were obtained.

The sonicated extracts were centrifuged, and their chromatin yield was evaluated by means of ultraviolet spectrometry. Equal amounts of chromatin were precleared with blocked protein G-Sepharose and incubated by overnight rotation with 1 μ g of primary anti-REST/NRSF antibodies (Upstate, Millipore, Billerica, MA, USA) and the same amount of non-specific rabbit IgG as a negative control; as a positive control, 0.5 μ g of anti-histone H3 were used to immunoprecipitate the same chromatin. Protein G-Sepharose (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was added and followed by 2 h of incubation with rotation. The beads were spun at 10 000 \times g for 30 s and then washed sequentially with increasing concentrations of salts and non-ionic detergents: a first wash with a solution of 10 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate; and a second wash with 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% NP40, 0.5% sodium deoxycholate. Finally, the beads were eluted with 1% SDS in 0.1 mM NaHCO₃, and the bound fractions were de-cross-linked by adding 200 mM NaCl and incubating at 65°C for 6–8 h. The de-cross-linked samples were treated with RNase and proteinase K, and the DNA was purified using phenol-chloroform, precipitated with two volumes of absolute ethanol, and then washed twice with 70% ethanol, after which the pellets were resuspended in 50 μ L of HPLC water.

Quantitative real-time PCR (iCycler thermal cycler with Multicolor Real-time PCR Detection System, Bio-Rad) with SYBR Green incorporation was used to assess REST/NRSF occupancy, with three independent experiments being performed for each RE1/NRSE-containing site. The PCRs were performed in a total volume of 20 μ L containing equal amounts of input and immunoprecipitated DNA, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM dNTPs, 25 U/mL iTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR Green I, 10 nM fluorescein, stabilizers (iQ SYBR Green Supermix; Bio-Rad) and 0.2 μ M of forward and reverse primers. Input from the chromatin that had been cross-linked reversed like the analysed samples was used to control PCR effectiveness.

We used primers flanking the RE1/NRSE sites of the following genes:

- *LILRB4* Fw: 5'-GGCCCAGCTCATACAAATG-3';
- *LILRB4* Rev: 5'-AGGCTTCCACTGTTTTCTGGT-3';
- *IGLL1* Fw: 5'-GGAAGCAGCCTTGGACTTTTT-3'; and
- *IGLL1* Rev: 5'-GCCCTGGACTCAAT-3'.

In parallel, anti-REST/NRSF-immunoprecipitated genomic DNA was also assessed by means of real-time PCR using primers set on genomic regions distal to any RE1/NRSE sites represented by coding regions of the selected genes (see the primer sequences

used for the qualitative PCR experiments). In addition, DNA from the same chromatin immunoprecipitation underwent quantitative real-time PCR for β -actin, a gene that is not regulated by REST/NRSF and not proximal to any RE1/NRSEs, using the following primers:

- β -actin Fw: 5'-TGCCTAGGTCACCCACTAATG-3'; and
- β -actin Rev: 5'-GTGGCCCGTGATGAAGGCTA-3'.

The PCR amplification cycle was 95°C for 3 minutes, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Fluorescence was quantified during the 60°C annealing step, and product formation confirmed by melting curve analysis (55–94°C). The immunoprecipitated DNA for the different RE1/NRSE loci was quantified using a standard curve (nanograms of DNA).

The binding of REST/NRSF to RE1/NRSEs was calculated as nanograms of DNA IP REST antibody per nanogram of DNA IP IgG. Similarly, the binding of histone H3 to each of the RE1/NRSEs (the positive control of the ChIP assay) was calculated as nanograms of DNA IP H3 per nanogram of DNA IP IgG.

ChIP scanning assay

This used the ChIP protocol described earlier. Cross-linked REST/NRSF DNA complexes were precipitated with anti-REST/NRSF antibody, and quantitative real-time PCR was performed on the precipitated DNA fragments using three pairs of oligonucleotide primers designed to produce amplicons covering the RE1/NRSE site in the *LILRB4* gene (see earlier discussion), and flanking sequences located at about 16.000 bp and 3.000 bp upstream and 10.000 bp downstream of the RE1/NRSE; the primers located 16.000 bp upstream of RE1/NRSE overlapped the coding region of *LILRB4*. The primers were:

- *LILRB4* cds Fw: 5'-GCTGCCGTGAAGAACACACAG-3';
- *LILRB4* cds Rev: 5'-AGTGTCCATCTGTCTGTCTCT-3';
- *LIRB4* 3.000 Fw: 5'-CATCTGCAAGTACAGTGACAGTG-3';
- *LIRB4* 3.000 Rev: 5'-GCTCCAACCTTCTCAGTCGACTA-3';
- *LIRB4* 10.000 Fw: 5'-GCTGTTTACCAGCTAAGAGCTC-3'; and
- *LIRB4* 10.000 Rev: 5'-CAAGCCATTGAAGCCATTGTCATG-3'.

The same procedure was performed to produce amplicons covering the RE1/NRSE site in the *IGLL1* locus, and flanking sequences located 28.542 bp upstream and 62.000 bp downstream of the RE1/NRSE; the primers located 28.542 bp upstream of RE1/NRSE overlapped the coding region of *IGLL1*. The primers were:

- *IGLL1* cds Fw: 5'-ACAGCTGCATCGCAGAGCA-3';
- *IGLL1* cds Rev: 5'-TTGGAGCTCCTCAGAGGACG-3';
- *IGLL1* 62.000 Fw: 5'-CATTCTAGCATAGAGAACACCTGTG-3';
- *IGLL1* 62.000 Rev: 5'-GCATTTACCAATCTAAGTCAATAGCC-3'.

As described earlier, DNA from the same chromatin immunoprecipitation underwent quantitative real-time PCR for β -actin, a gene that is not regulated by REST/NRSF and not proximal to any RE1/NRSEs.

Quantitative PCR was performed in a total volume of 20 μ L containing equal amounts of input and immunoprecipitated DNA, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM dNTPs, 25 U/ml iTaq DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR Green I, 10 nM fluorescein, stabilisers (iQ SYBR Green Supermix; Bio-Rad) and

0.2 μ M of forward and reverse primers, using the following amplification protocol: 95°C for 3 minutes, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Fluorescence was quantified during the 60°C annealing step, and product formation confirmed by melting curve analysis (55–94°C). The immunoprecipitated DNA for the different RE1/NRSE loci was quantified using a standard curve (nanograms of DNA). The binding of REST/NRSF to the RE1/NRSEs was calculated as nanograms of DNA IP REST antibody per nanogram of DNA IP with rabbit IgG.

Statistical analyses

As the REST occupancy and REST mRNA values do not follow a normal distribution, the non-parametric, two-tailed Mann-Whitney *U*-test was used for the statistical analyses, with a *P* value of <0.05 being considered significant. Median values were used for the same reason. In each figure, the boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median or 50th percentile and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles.

Three or more unpaired groups were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. The correlations were assessed using Spearman's rank correlation coefficient.

RESULTS

In silico identification of RE1/NRSE sites regulating lymphocyte-specific genes

We started to search for putative REST/NRSF target genes expressed in the immunosystem by interrogating http://bioinformatics.leeds.ac.uk/RE1db_mkII/, a database containing genomic human and mouse RE1/NRSE sequences that identifies the predictive binding sites of REST/NRSF to RE1/NRSE by means of RE1 position-specific scoring matrices (PSSMs) and the putative gene regulated by each RE1/NRSE locus (11). Most of the selected REST-binding sites are functional. Using an RE1 0.91 PSSM cut-off score and restricting the search to the immunospecific RE1/NRSE loci allowed us to identify 13 different RE1/NRSE sites that putatively regulate various genes expressed in the human immune system, of which we selected two that had a high RE1 PSSM cut-off score and were positioned closest to predicted regulated lymphocyte-specific genes. The first was an RE1 (ID number hum40753; cut-off score 0.916) that putatively modulates the leukocyte Ig-like receptor, subfamily B, member 4 gene (*LILRB4*), and the second (ID number RE1 hum43244; cut-off score 0.912) possibly controls the *IGLL1* gene.

LILRB4 is a member of the leukocyte Ig-like receptor (LIR) family, which is found in a gene cluster at chromosomal region 19q13.4. The encoded protein belongs to the subfamily B class of LIR receptors that contains two or four extracellular Ig domains, a transmembrane domain and 2–4 cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (1, 3). More specifically, *LILRB4* is an inhibitory Ig-like receptor, which transduces a negative signal that inhibits the stimulation of an immune response and then

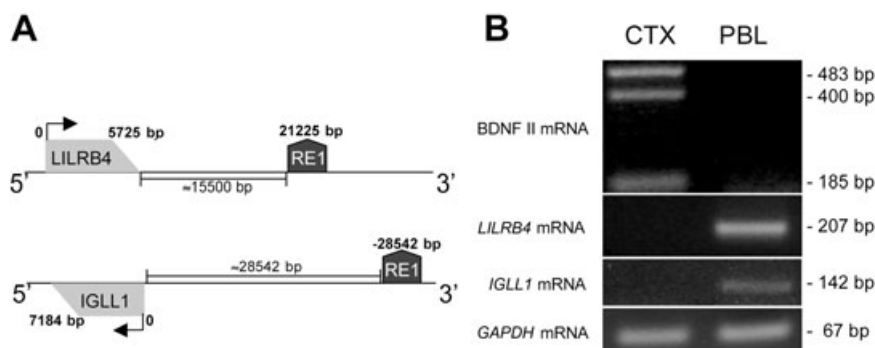


Figure 1. Repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF)-target genes are expressed in lymphocytes. **A.** Schematic representation of the positions of the leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4 (*LILRB4*) and immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 precursor (*IGLL1*) REST/NRSF target genes and repressor element-1/neuron-restrictive silencer element (RE1/NRSE) on chromosomes 19 and 22. The gray box identifies the gene, and the arrows indicate the transcriptional direction. The RE1/NRSE locus is indicated by the dark grey box. The distance of RE1/NRSE from the genes is calculated by taking the first gene nucleotide (the NC_000019 region from 59865936 to 59871660 for *LILRB4*

and the NC_000022 region (complement) from 22245312 to 22252495 for *IGLL1*) as 0. **B.** Qualitative polymerase chain reaction shows that *LILRB4* and *IGLL1* are expressed in lymphocytes, but they are not expressed in the cerebral cortex that expresses brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA II, a neuronal isoform of BDNF under the control of REST/NRSF. The presence of three functional donor sites in human BDNF exon II leads to the production of the three BDNF isoforms, BDNF IIA, IIB and IIC. The *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) gene was amplified as a housekeeping gene (data are from one of three independent PCR experiments). Abbreviations: CTX = cortex; PBL = peripheral blood lymphocytes.

controls inflammatory responses and cytotoxicity in order to help focus the immune response and limit autoreactivity (7, 9).

IGLL1 is a member of the Ig gene superfamily, and the only functional gene of three genes belonging to a lambda-like gene cluster located in chromosomal region 22q11.2. These genes encode the surrogate light chain subunits of a pre-B-cell receptor that is involved in the transduction of signals for cell proliferation, differentiation from the pro-B to the pre-B-cell stage, allelic exclusion at the Ig heavy chain gene locus and promotion of Ig light chain gene rearrangement (12, 14, 17).

Figure 1A shows the position of RE1/NRSE (determined by the RE1/NRSE database and subsequently confirmed by BLAST analyses): the hum40753 RE1/NRSE site is located 15.500 bp 3' of the *LILRB4* gene; and the hum43244 RE1/NRSE site is located 28.542 bp 5' of the *IGLL1* gene.

It has previously been demonstrated that many RE1/NRSE regulated genes that are silent in non-neural cells are inaccessible to REST/NRSF (2, 19), and so we evaluated whether *LILRB4* and *IGLL1* are actively transcribed in cultured human lymphocytes. Figure 1B shows that *LILRB4* and *IGLL1* mRNAs are present in control lymphocytes but, as expected, not in post-mortem human cortical tissue. These findings indicate that *LILRB4* and *IGLL1* are actively transcribed in lymphocytes and, therefore, are potentially accessible to REST/NRSF.

Development of a protocol for assessing REST/NRSF occupancy in human lymphocytes

We then set up an accurate and reproducible method for immunoprecipitating the selected REST/NRSF target sequences in human lymphocytes.

Preparing lymphocytes from fresh blood

The blood samples were processed using Lympholyte Mammal (Tebu-Bio) a maximum of 2–3 h after they were drawn, and a high-quality fresh population of lymphocytes and monocytes was obtained. The preparation of lymphocytes from fresh blood is a critical step in this protocol as blood processing after storage at 4°C for longer than 8 h causes a high rate of cell death and red cell contamination that make the samples analytically useless.

ChIP of fresh chromatin from cultured lymphocytes

In a first attempt to perform the REST/NRSF ChIP assay, fresh lymphocytes and monocytes were processed to obtain the chromatin lysates that were then precleared as indicated in the Material and Methods section, and stored at –20°C for practical reasons before being immunoprecipitated with the anti-REST/NRSF antibody; the REST/NRSF ChIP assay did not work when thawed samples were tested. This clearly indicates that REST/NRSF ChIP must be performed on fresh chromatin samples.

In order to overcome this problem, the lymphocyte/monocyte cultures were set up on the day the blood was collected. In addition to providing fresh cells for the ChIP assay, the culture method allowed us to separate the lymphocytes from monocytes, which adhered to the cell plate. After overnight culture, the suspended lymphocytes were processed to obtain chromatin, which was immediately immunoprecipitated with anti-REST/NRSF antibodies (see Supporting Information Figure S1 for lymphocytes recovery, counting and plating).

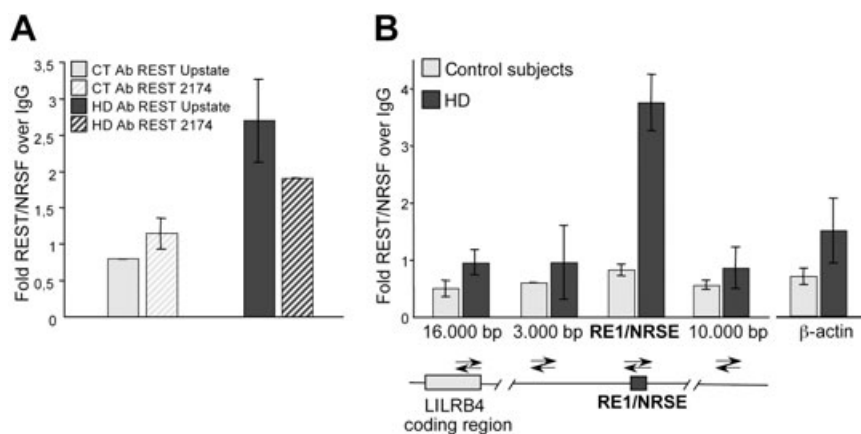


Figure 2. Repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) chromatin immunoprecipitation (ChIP) in human lymphocytes is specific. **A.** ChIP at the RE1/NRSE of the leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4 (*LILRB4*) locus using two different anti-REST/NRSF antibodies; the similar results confirm the specificity of the ChIP assay. In addition, repressor element-1/neuron-restrictive silencer element (RE1/NRSE) occupancy of the *LILRB4* locus was greater in the patients with Huntington's disease (HD) than in the controls (CT). **B.** ChIP scanning of the *LILRB4* locus. Quantitative real-time polymerase chain reaction was per-

formed on the precipitated DNA fragments using four pairs of oligonucleotide primers designed to produce amplicons covering the RE1/NRSE site in the *LILRB4* gene and flanking sequences, located 16.000 bp, on coding region of *LILRB4*, and 3.000 bp upstream and 10.000 bp downstream of the RE1/NRSE. The scanning ChIP assay shows peak of REST/NRSF occupancy centered at the RE1/NRSE site of the *LILRB4* gene. There is no enrichment in distal regions or in the coding region of *LILRB4* and the β -actin gene, which is not regulated by REST/NRSF. Abbreviations: IgG = immunoglobulin G.

Functional evaluation of REST/NRSF interactions with bona fide RE1/NRSE targets

To verify whether REST/NRSF could bind the *LILRB4* RE1/NRSE locus in *in vivo* human samples, we performed the ChIP assay using two different anti-REST antibodies: one from UpState and one (Ab 2174) from N. Buckley's lab at King's College, London. Figure 2A shows that α REST/NRSF from UpState and α REST 2174 immunoprecipitate REST/NRSF with the same efficiency. It was also observed that RE1/NRSE occupancy of the *LILRB4* locus was greater in HD subjects than in the control subjects. Similar results were obtained when REST/NRSF occupancy was evaluated at the RE1/NRSE proximal to the *IGLL1* locus (Supporting Information Figure S2).

ChIP with the H3 antibody was used as a positive control. Histone H3 is a core component of chromatin that is bound to most DNA sequences throughout the genome, including the RE1/NRSE locus. All of the samples used for the analyses showed high levels of H3 occupancy at the RE1/NRSE sites proximal to the selected genes (Supporting Information Figure S3).

ChIP scanning was used to confirm the specificity of REST/NRSF enrichment at the *LILRB4* locus. Immunoprecipitated genomic DNA with α REST/NRSF from UpState was assessed by means of real-time PCR using four pairs of oligonucleotide primers designed to produce amplicons covering the *LILRB4* RE1/NRSE site and flanking sequences located 10.000 bp downstream, and 3.000 bp and 16.000 bp upstream of the RE1/NRSE. The assay showed peak REST/NRSF occupancy centered on the RE1/NRSE site of the *LILRB4* gene, with no enrichment at distal regions 3.000 bp upstream or 10.000 bp downstream, and no enrichment at a distal 16.000 bp that overlapped with the coding region of

LILRB4. ChIP scanning was performed also at the *IGLL1* locus (Supporting Information Figure S2).

Finally, no REST/NRSF occupancy was detected at the promoter of the β -actin gene, which is not regulated by REST/NRSF (Figure 2B), thus further confirming the specificity of the REST/NRSF ChIP assay.

REST/NRSF occupancy of RE1/NRSE targets is higher in HD lymphocytes

We designed a pilot study to assess REST/NRSF occupancy of the *LILRB4* and *IGLL1* RE1/NRSE sites in lymphocytes taken from controls and HD subjects. These ChIP analyses were performed on chromatin extracted from cultured lymphocytes taken from 31 HD patients, five presymptomatic gene carriers, 17 controls and seven patients with SCA1-2-6. In all cases, the patients were examined in the clinic where their blood was drawn and immediately processed.

Figure 3A shows REST/NRSF occupancy at the *LILRB4* locus in each of the analysed samples. The endogenous binding of REST/NRSF to the *LILRB4* locus was greater in the chromatin samples from the HD subjects than in the samples taken from controls. As most of the REST/NRSF occupancy values in the control and HD groups did not fit a normal distribution curve, the non-parametric Mann-Whitney *U*-test was used to determine the statistical significance of REST/NRSF occupancy between the two cohorts, and it revealed that occupancy was significantly increased in the HD group ($P = 0.0003$, two-tailed test); no increase in REST/NRSF occupancy was found in the small group of five presymptomatic gene carriers ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test). In parallel with the HD subjects, the seven SCA1-2-6 patients were tested and the values of REST/NRSF occupancy at the RE1/NRSE site proximal

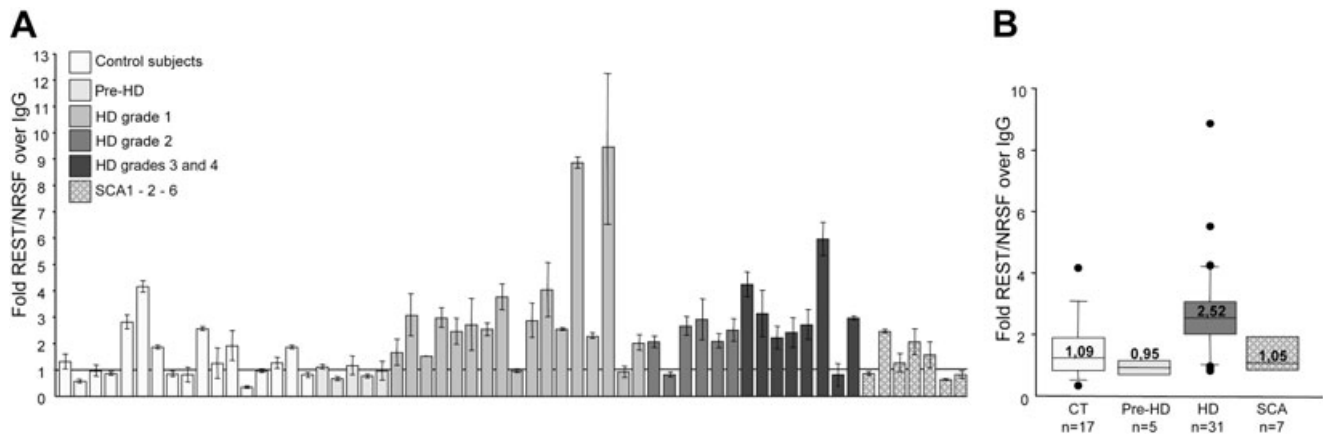


Figure 3. Repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) occupancy of the repressor element-1/neuron-restrictive silencer element (RE1/NRSE) locus of the leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4 (*LILRB4*) gene. **A.** REST/NRSF occupancy of the RE1/NRSE locus of the *LILRB4* gene in control (CT), pre-Huntington's disease (HD), HD and spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 6 (SCA type 1, 2 and 6) subjects. Each column represents the average value \pm standard deviation of three independent quantitative polymerase chain reaction experiments using genomic DNA immunoprecipitated with anti-REST/NRSF antibody. **B.** Median REST/NRSF occupancy in the CT and HD groups. REST/NRSF

occupancy was significantly greater in the HD patients than in the CT (two-tailed Mann-Whitney test: $P = 0.0003$), and in the pre-HD (Kruskal-Wallis test: $P < 0.01$) and SCA subjects (Kruskal-Wallis test: $P < 0.05$), with no statistical difference between the CT and pre-HD (Kruskal-Wallis test: $P > 0.05$) or spinocerebellar ataxia (SCA) samples (Kruskal-Wallis test: $P > 0.05$). The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Outliers are indicated as black circles. Abbreviations: IgG = immunoglobulin G.

to the *LILRB4* locus were similar to those detected in control subjects ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test). These data suggest that increased REST/NRSF occupancy in HD lymphocytes is a specific molecular phenotype determined by the polyQ expansion in huntingtin protein. Figure 3B shows the median values, which better represent the average value of not normally distributed data and also reduce the skewing caused by outliers.

To confirm the presence of an altered REST/NRSF genomic profile in HD lymphocytes, we analyzed the association between REST/NRSF and the RE1/NRSE locus proximal to the *IGLL1* gene. Figure 4A shows the REST/NRSF occupancy of the RE1/NRSE *IGLL1* locus in controls ($n = 10$) and presymptomatic ($n = 5$), HD ($n = 13$) and SCA1-2-6 patients ($n = 6$). In line with the ChIP *LILRB4* locus data, REST/NRSF showed a closer association with the RE1/NRSE of the *IGLL1* gene in HD lymphocytes (Mann-Whitney U -test $P = 0.0002$, two-tailed). There was no difference in REST/NRSF occupancy between the controls and the presymptomatic gene carriers ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test) or SCA1-2 patients ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test).

Spearman's correlation analyses showed that REST/NRSF occupancy in HD patients did not correlate with the UHDRS motor score (RE1/NRSE in *LILRB4*: Spearman's ρ (Sp) -0.2160 ; $P = 0.24$; RE1/NRSE in *IGLL1*: Sp -0.03444 ; $P = 0.91$), TFC (RE1/NRSE in *LILRB4*: Sp -0.056 ; $P = 0.76$; RE1/NRSE in *IGLL1*: Sp 0.3223 ; $P = 0.28$), age (RE1/NRSE in *LILRB4*: Sp 0.1254 ; $P = 0.5014$; RE1/NRSE in *IGLL1*: Sp 0.1956 ; $P = 0.52$) or disease duration (RE1/NRSE in *LILRB4*: Sp 0.2791 ; $P = 0.13$; RE1/NRSE in *IGLL1*: Sp 0.2808 ; $P = 0.35$). Finally, there was no correlation between REST/NRSF occupancy and the length of the CAG repeat on the expanded allele, possibly because of the very similar CAG repeat length

among the HD patients. Twenty-nine of the 31 HD patients were being treated with two or more drugs that mainly included selective reuptake inhibitors (selective serotonin re-uptake inhibitors, selective serotonin-norepinephrine re-uptake inhibitors), neuroleptics and benzodiazepines (see Supporting Information Table S1), but because of the small number of untreated HD patients, we could not look for any effect of drug treatment on REST/NRSF occupancy.

REST/NRSF mRNA levels in control and HD patients

To demonstrate that the increased binding of REST/NRSF to RE1/NRSE in HD lymphocytes did not depend on increased levels of REST/NRSF, we performed a real-time PCR analysis to evaluate REST/NRSF mRNA levels on total RNA extracted from the cultured lymphocytes of 11 HD and 6 control subjects. No differences were found in the level of REST/NRSF mRNA normalized to GAPDH mRNA content (Figure 5). We therefore concluded that the increased occupancy of RE1/NRSE by REST/NRSF in human HD lymphocytes is caused by the increased binding of REST/NRSF to the RE1/NRSE sites (19, 20).

DISCUSSION

Transcription factor occupancy profiling has previously been applied to cell and mouse models of HD and human brain tissues (10, 21) but not to the blood of HD patients. We therefore used ChIP to provide the first functional evidence that the binding of the REST/NRSF repressor to its target RE1/NRSE sites can be monitored in fresh human lymphocytes.

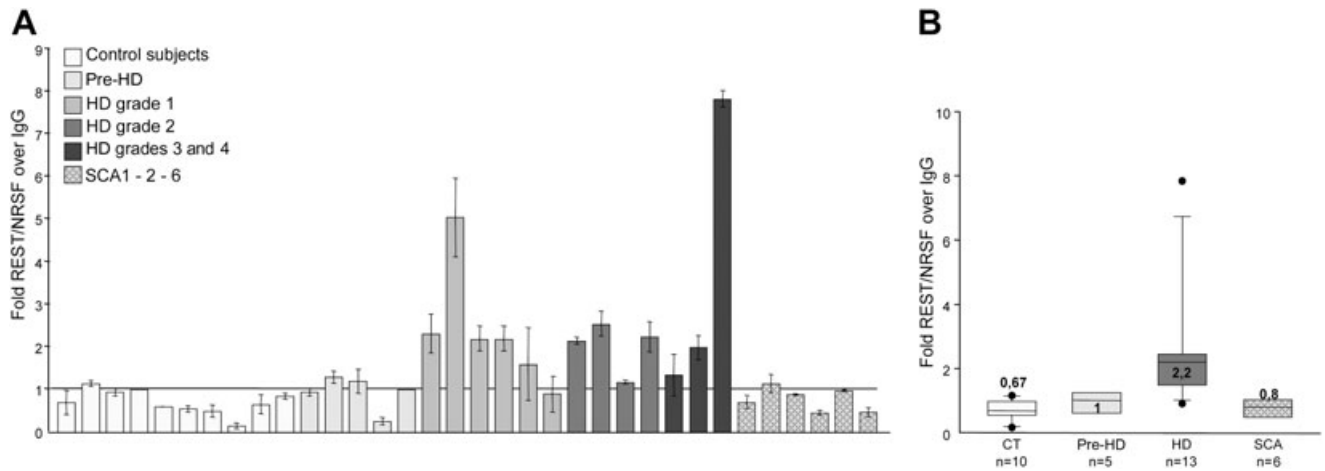


Figure 4. Repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) occupancy at the repressor element-1/neuron-restrictive silencer element (RE1/NRSE) of the immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 precursor (*IGLL1*) gene. **A.** REST/NRSF occupancy of the RE1/NRSE of the *IGLL1* gene. Each column represents the average value \pm standard deviation of three independent quantitative polymerase chain reaction experiments. **B.** Median REST/NRSF occupancy levels in the control (CT) and Huntington’s disease (HD) groups. RE1/NRSE occupancy was significantly greater in the HD patients than in the CT (two-tailed Mann–Whitney test: $P = 0.0002$), and

in the pre-HD (Kruskal–Wallis test: $P < 0.01$) and spinocerebellar ataxia (SCA) subjects (Kruskal–Wallis test: $P < 0.05$), with no statistical difference between the CT and the pre-HD (Kruskal–Wallis test: $P > 0.05$) or SCA subjects (Kruskal–Wallis test: $P > 0.01$). The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Outliers are indicated as black circles.

The application of REST/NRSF ChIP to a small cohort of HD and control subjects demonstrated that mutant huntingtin increases REST/NRSF occupancy at RE1/NRSE sites in lymphocytes from HD patients in comparison with controls, thus clearly indicating that the genome of HD lymphocytes has similar pathological hallmarks to those previously characterized in HD brain (20, 21).

Although tested in a small number of cases, the increased REST/NRSF occupancy was not found in the circulating cells of presymptomatic individuals carrying the CAG mutation, which

suggests that increased REST/NRSF binding in blood may occur at the same time as the appearance of disease symptoms. Interestingly, REST/NRSF occupancy was similar in the controls and the SCA1-2-6 patients, and so we suggest that increased REST/NRSF occupancy at selected RE1/NRSE sites may be a specific molecular phenotype strictly related to the presence of the elongated polyQ expansion in huntingtin.

We did not find any correlations with disease severity, the length of the polyQ expansion or other disease parameters because of the

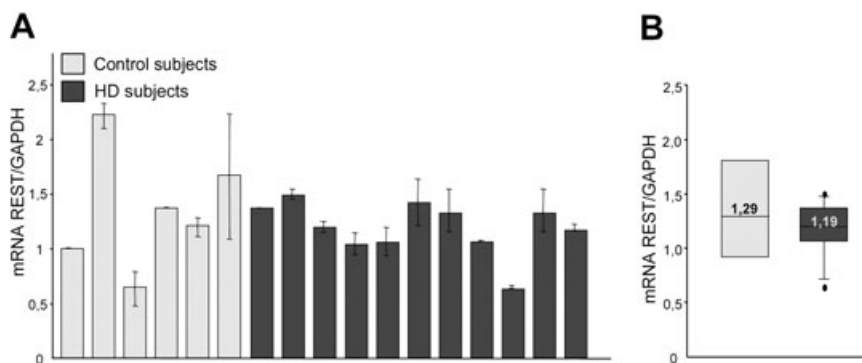


Figure 5. Levels of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) mRNA in lymphocytes from subjects with Huntington disease (HD) and control subjects. Total levels of REST/NRSF mRNA were analyzed by means of quantitative polymerase chain reaction (PCR) and normalized to the level of *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) mRNA. **A.** REST/NRSF mRNA levels were similar in the controls and HD subjects. **B.** Median

REST/NRSF mRNA levels. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Outliers are indicated as black circles. The values are the averages \pm standard deviation of three independent PCR experiments.

small number of analyzed patients. However, we do provide evidence that chromatin from human lymphocytes represents a valuable tool when seeking peripheral transcriptional dysfunctions, and that DNA target sequences on genomic DNA may be reliable peripheral markers of HD. We also found that two major conditions need to be considered when approaching ChIP studies of blood: to use fresh blood and immunoprecipitate the target sites on fresh chromatin. The time between blood drawing, storage and processing greatly affects the quality and specificity of the ChIP assay, as well as the yield and quality of RNA and protein, as suggested by our other studies of human blood (Tarditi *et al*, unpub. obs.). Coordination between clinical sites and laboratories is imperative for the immediate processing of blood samples for ChIP studies.

As mutant huntingtin affects widely expressed transcription factors, transcriptional dysregulation in HD has recently been the subject of various analytical approaches aimed at identifying potential biomarkers. Although the early results indicated a battery of mRNA as potential markers of HD progression in blood (4), subsequent studies based on the same approach have not confirmed these data (16), indicating that transcriptomic analyses may be a highly variable and risky means of tracking molecular changes in human samples when seeking correlations with HD onset and progression. These findings therefore suggest that other biomarker identification strategies monitoring transcriptional dysfunction are particularly important. Our data indicating that the immunoprecipitation of selected transcription factor target sites is reproducible, sensitive and specific suggest that ChIP may be more advantageous than strategies based on detecting blood RNA. The specificity of the targeted genomic sequence may significantly reduce multifactorial variability in the event controlling the production and stability of specific mRNA or protein.

We concluded that ChIP of the RE1/NRSE sites is a suitable indicator of HD peripheral dysfunction at specific transcription factor binding sites. However, we are conscious that it is premature to propose the REST/NRSF ChIP as a biomarker because the analyses should be extended to a larger population of control and HD subjects.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Alberto Clivio of the Department of Pre-clinical Science, Faculty of Medicine, University of Milan, for his generous hospitality and collaboration. This research was funded by Fondazione Cariplo (Italy), NeuroNE (European Union's 6th Framework Programme) and STEM-HD (European Union's 6th Framework Programme) to E. Cattaneo, who is a member and coordinator of the Huntingtin Function Team, Huntington's Disease Society of America Coalition for the Cure.

REFERENCES

1. Arm JP, Nwankwo C, Austen KF (1997) Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49b1 inhibitory receptor. *J Immunol* **159**:2342–2349.
2. Belyaev ND, Wood IC, Bruce AW, Street M, Trinh JB, Buckley NJ (2004) Distinct RE-1 silencing transcription factor-containing complexes interact with different target genes. *J Biol Chem* **279**:556–561.

3. Borges L, Hsu M-L, Fanger N, Kubin M, Cosman D (1997) A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* **159**:5192–5196.
4. Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J, Jeong H, Then F, Rosas HD *et al* (2005) Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:11023–11028.
5. Bruce AW, Donaldson IJ, Wood IC, Yerbury SA, Sadowski MI, Chapman M *et al* (2004) Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:10458–10463.
6. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* **6**:919–930.
7. Cella M, Dohring C, Samaridis J, Dessing M, Brockhaus M, Lanzavecchia A, Colonna M (1997) A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* **185**:1743–1751.
8. Cha JH (2007) Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* **83**:228–248.
9. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F *et al* (2002) Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* **3**:237–243.
10. Chen-Plotkin AS, Sadri-Vakili G, Yohrling GJ, Braveman MW, Benn CL, Glajch KE *et al* (2006) Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **22**:233–241.
11. Johnson R, Gamblin RJ, Ooi L, Bruce AW, Donaldson IJ, Westhead DR *et al* (2006) Identification of the REST regulon reveals extensive transposable element-mediated binding site duplication. *Nucleic Acids Res* **34**:3862–3877.
12. Mattei MG, Fumoux F, Roeckel N, Fougereau M, Schiff C (1991) The human pre-B-specific lambda-like cluster is located in the 22q11.2–22q12.3 region, distal to the IgC lambda locus. *Genomics* **9**:544–546.
13. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model from qualification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
14. Pillai S, Baltimore D (1988) The omega and iota surrogate immunoglobulin light chains. *Curr Top Microbiol Immunol* **137**:136–139.
15. Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB (1998) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:5733–5737.
16. Runne H, Kuhn A, Wild EJ, Pratyaksha W, Kristiansen M, Isaacs JD *et al* (2007) Analysis of potential transcriptomic biomarkers for Huntington's disease in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:14424–14429.
17. Schiff C, Milili M, Fougereau M. (1989) Isolation of early immunoglobulin lambda-like gene transcripts in human fetal liver. *Eur J Immunol* **19**:1873–1878.
18. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**:971–983.
19. Wood IC, Belyaev ND, Bruce AW, Jones C, Mistry M, Roopra A, Buckley NJ (2003) Interaction of the repressor element 1-silencing transcription factor (REST) with target genes. *J Mol Biol* **334**:863–874.
20. Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L *et al* (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* **35**:76–83.
21. Zuccato C, Belyaev N, Conforti P, Ooi L, Tartari M, Papadimitou E *et al* (2007) Widespread disruption of repressor element-1 silencing

transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci* **27**:6972–6983.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. A schematic representation of the procedure to isolate fresh lymphocytes to be used in the REST ChIP assay.

Figure S2. The graph shows the positive control routinely performed in the assay ie, histone H3 at the RE1/NRSE loci calculated as ng DNA IP H3/ng DNA IP IgG. Similar controls were performed on chromatin lysates from all the subjects included in this study.

Figure S3. **A.** ChIP at the RE1/NRSE of the *IGLL1* locus using two different anti REST/NRSF antibodies. **B.** ChIP scanning was used to confirm the specificity of REST/NRSF enrichment at the *IGLL1* locus.

Table S1. Pharmacological treatments administered to the patients included in this study.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

RESEARCH ARTICLE

Systematic Assessment of BDNF and Its Receptor Levels in Human Cortices Affected by Huntington's Disease

Chiara Zuccato¹; Manuela Marullo¹; Paola Conforti¹; Marcy E MacDonald²; Marzia Tartari¹; Elena Cattaneo¹

¹ Department of Pharmacological Sciences and Center for Stem Cell Research, University of Milan, Milan, Italy.

² Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Richard B. Simches Research Center, Boston, Mass.

Keywords

BDNF, TrkB, T-Sch, p75^{NTR}, Huntington's disease, human brain.

Correspondence author:

Elena Cattaneo, PhD, Department of Pharmacological Sciences and Center for Stem Cell Research, University of Milan, Via Balzaretto 9, 20133 Milan, Italy (E-mail: elena.cattaneo@unimi.it)

Received: 11 July 2007; revised 26 September 2007; accepted 2 October 2007.

doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00111.x

Abstract

One cardinal feature of Huntington's disease (HD) is the degeneration of striatal neurons, whose survival greatly depends on the binding of cortical brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with high-affinity (TrkB) and low-affinity neurotrophin receptors [p75 pan-neurotrophin receptor (p75^{NTR})]. With a few exceptions, results obtained in HD mouse models demonstrate a reduction in cortical BDNF mRNA and protein, although autopsy data from a limited number of human HD cortices are conflicting. These studies indicate the presence of defects in cortical BDNF gene transcription and transport to striatum. We provide new evidence indicating a significant reduction in BDNF mRNA and protein in the cortex of 20 HD subjects in comparison with 17 controls, which supports the hypothesis of impaired BDNF production in human HD cortex. Analyses of the BDNF isoforms show that transcription from BDNF promoter II and IV is down-regulated in human HD cortex from an early symptomatic stage. We also found that TrkB mRNA levels are reduced in caudate tissue but not in the cortex, whereas the mRNA levels of T-Shc (a truncated TrkB isoform) and p75^{NTR} are increased in the caudate. This indicates that, in addition to the reduction in BDNF mRNA, there is also unbalanced neurotrophic receptor signaling in HD.

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD), a dominantly inherited and progressive neurodegenerative disease, is caused by an abnormal expansion of a polyglutamine tract close to the N-terminus of the huntingtin protein (51). Although mutant huntingtin is ubiquitously expressed (52), and it is known that global and early neuronal dysfunction occurs in the brains of HD patients (44, 45), the loss of neurons in the caudate nucleus and cerebral cortex is a hallmark of the disease (42).

Since the discovery of the HD gene in 1993, genetic and experimental evidence has provided insights into the pathogenesis of HD, and many hypotheses concerning its underlying mechanisms are now being investigated. One that we put forward in 2001 is that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) depletion originating in the cortex may make striatal neurons more vulnerable (57).

BDNF is a small dimeric protein that was discovered in 1982 (7) as the second in a family of molecules with neurotrophic activities. It is primarily synthesised as a 32 kDa precursor known as pro-BDNF, whose cleavage in the *trans*-Golgi network or secretory granules generates a mature 14 kDa biologically active form that is secreted in a basal and activity-dependent manner (8). Interestingly, more recent findings attribute a functional role to pro-BDNF at synaptic terminals that triggers intracellular pathways other than mature BDNF or promotes apoptotic cell death (41, 50). BDNF is widely expressed in the adult mammalian central nervous system,

but is particularly abundant in the hippocampus and cerebral cortex (34). Its expression increases during brain development, peaks after birth (6, 27, 28), and the fact that it does not seem to decline with age suggests that it plays an essential role in the adult central nervous system (6, 27, 28). BDNF has survival- and growth-promoting activity on a variety of neurons, and in addition to its important role in neuronal development and cell survival, it is also involved in neuronal plasticity as it controls activity-dependent synaptic transmission (8).

It is known that BDNF is very important for the striatal neurons that die in HD. These require BDNF for their survival and differentiation during development (2, 24, 33, 36, 53, 54), and it also protects them against excitotoxicity, which may be involved in the degeneration observed in HD patients (30, 38, 39, 55). However, striatal neurons do not produce their own BDNF, which is anterogradely transported through the cortical afferents to the point that 95% of the BDNF found in the striatum is of cortical origin (3, 6).

There is now a considerable amount of evidence indicating that defects in cortical BDNF production or its delivery to striatal targets may contribute to the development of HD (56). We have previously reported that, in HD cells and animal models, wild-type huntingtin acts at the level of the BDNF promoter to facilitate its gene transcription, thus participating in the physiological production of cortical BDNF (57), whereas mutation in huntingtin has a loss-of-function effect on BDNF gene transcription. In addition, by acting at the level of a different portion of the BDNF promoter,

mutant huntingtin further represses BDNF gene transcription (56). Together, these events cause a net depletion in BDNF mRNA and protein in HD cells and mice. A large number of subsequent experiments using different HD mouse models have further confirmed the evidence of a depletion in cortical BDNF mRNA and protein (56). A different, but not mutually exclusive hypothesis indicates that the same amount of BDNF is produced in the cortex of HD subjects and controls, but its transport from the cortex to the striatum is reduced in the presence of the mutant protein (16).

Post-mortem assessments of BDNF mRNA and protein in human tissue have led to conflicting findings that are mainly caused by differences in analytical methods. Western blot analyses of the parietal cortex, temporal cortex, hippocampus, caudate and putamen of four grade three HD subjects, indicated that the levels of mature BDNF protein (14 kDa) were between 53% and 82%, less in the caudate and putamen of the HD subjects than in samples from six age-matched controls, but preserved in the parietal and temporal cortex, and the hippocampus (15). The findings of a second Western blot study of ten HD patients and seven controls by Gauthier *et al* were in line with these data, showing that mature BDNF protein levels were reduced by about 50% in the striatum of HD patients, but not in the cerebral cortex (16). However, we have previously shown that the levels of BDNF protein (as assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which not only detects the mature form, but also the other processed forms including pro-BDNF) and BDNF mRNA in the human cortex are consistent with those observed in the various transgenic mouse models of HD: that is, there was a 50% decrease in BDNF levels in the

frontoparietal cortex of two subjects with grade 2 and 3 HD in comparison with two age-matched controls (57).

We have now expanded that work by quantifying BDNF levels in a larger number of samples of post-mortem cortical tissues from 20 subjects with HD (grades 2–4) and 17 gender- and age-matched controls. BDNF protein and mRNA were respectively evaluated by means of ELISA and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and, as previous data have indicated reduced BDNF promoter exon II and III activity in HD cells and mouse models of HD, we also determined the levels of the BDNF mRNA isoforms whose transcription is specifically driven by the homologous human promoters (21, 57, 58). We conclude that human HD is characterized by a statistically significant reduction in cortical BDNF mRNA (total and different isoforms) and protein.

As the biological effect of BDNF is mediated by the full-length TrkB receptor in cooperation with the truncated isoforms Trk-T1 (the dominant truncated isoform expressed in the adult brain), Trk-T2 (8, 41) and T-Shc (47), we evaluated Trk-B, Trk-T1 and T-Shc mRNA levels in a selection of cortical and striatal tissues from HD and control subjects, and found a reduction in TrkB mRNA levels in the caudate of the HD subjects, and increased expression of T-Shc. Finally, we also found that p75^{NTR} (13) mRNA levels are increased in the caudate, thus further confirming the dysfunction of Trk-mediated signaling in the brain of HD subjects.

MATERIALS AND METHODS

Human tissues

The post-mortem human brain tissues were obtained from the following sources: (i) *New York Brain Bank, Columbia University* (New York, NY, USA; Controls: T-168, T-111, T-274; HD grade 2: T-289; grade 4: T-128, T-291, T-178, T-260, T-310, T-329, T-354); (ii) *Harvard Brain Tissue Resource Center (HBTRC)* (Belmont, MA, USA; Controls: 6182, 6142, 6002, 5959, 5936, 5919, 5077, 5074, 5021; HD grade 2: 6051, 6121; grade 3: 5570, 5576, 6010, 6183; grade 4: 5507, 6062); (iii) *Massachusetts General Hospital (MGH) (Charlestown, MA, USA)*; Controls: 3688, 3888, 3746, 3899, 3932; HD grade 3: 3176, 3484, 3723, 2866).

It was not possible to compare the HBTRC samples 4741, 4744, 4751, 4719, 4754, 4797, 4680, 4740 and 4798 used by Gauthier *et al*, 2004, because of the unavailability of the same tissue.

We analyzed post-mortem human brain tissue (parietal cortex, Brodmann's area 7) taken from a total of 20 HD patients (Vonsattel's grade 2–4) and 17 gender- and age-matched controls, whose CAG repeat lengths, post-mortem interval, gender and disease grade are shown in Table 1. The HD cases for which the length of the CAG repeat for the pathological allele was not provided by the brain bank underwent genomic DNA extraction and genotyping for CAG length in the Laboratory of Molecular Genetics of the Division of Biochemistry and Genetics, Neurological Institute Carlo Besta, Milan, in accordance with the published methods for studying trinucleotide repeat diseases (17).

RNA isolation

Total RNA was isolated from 200–300 mg of human tissue using 2 mL of TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), after

Table 1. Characteristics of the human brain samples. Parietal cortex (BA7) and caudate have been used. HD samples are all in the pathological range (>35 CAG repeats). Abbreviations: IQR = interquartile range (25th–75th percentile); PMI = post-mortem interval; HD = Huntington's disease

| | |
|---------------|----|
| Controls | 17 |
| Male | 11 |
| Female | 6 |
| Age | |
| IQR | 15 |
| Median | 63 |
| PMI | |
| IQR | 5 |
| Median | 20 |
| HD | 20 |
| Male | 11 |
| Female | 9 |
| Age | |
| IQR | 15 |
| Median | 54 |
| CAG size | |
| IQR | 3 |
| Median | 45 |
| Grade | |
| Grade 2 | 3 |
| Grade 3 and 4 | 17 |
| PMI | |
| IQR | 10 |
| Median | 19 |

the tissues had been homogenized in liquid nitrogen with a mortar and pestle. To enhance RNA yield, the samples were precipitated by adding 2 μ L of glycogen solution (10 mg/mL) to isopropanol, and incubating them at -80°C overnight. The concentration of RNA was evaluated spectrophotometrically, and its quality was verified by means of agarose gel electrophoresis of 1 μ g of each sample. Genomic DNA was digested using 1 U rDNaseI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) per 1 μ g/ μ L of total RNA and incubation at 37°C for 10 minutes following the manufacturer's instructions. The total RNA was stored in aliquots at -80°C .

RNA retrotranscription

Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed to single-stranded cDNA using Superscript III RNaseH⁻ reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random primers in a volume of 20 μ L, according to the manufacturer's instructions. Two independent reverse transcription (RT) reactions were performed for every RNA stock.

Real-time PCR for total BDNF and Trk mRNA levels

Because of the large number of samples and their replicates in each PCR plate, different plates were run for BDNF and GAPDH. Three independent PCR analyses were made of each of two independent RT reactions, for a total of six independent measurements.

Using an iCycler Thermal Cycler with a Multicolor Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), all of the reactions were performed in a total volume of 25 μ L containing 50 ng cDNA, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM dNTPs, iTaq DNA polymerase, 25 units/mL, 3 mM MgCl₂, SYBR Green I, 10 nM fluorescein, stabilisers (iQTM SYBR Green Supermix-Biorad, Hercules, CA, USA), and 0.3 μ M of forward and reverse primers. The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 95°C for 3 minutes, followed by 45 cycles of 30 s at 95°C , 30 s at 60°C and 30 s at 72°C . Fluorescence was quantified during the 60°C annealing step, and product formation was confirmed by means of melting curve analysis (55°C – 94°C). The amounts of target gene mRNA were normalized to the reference gene GAPDH.

The BDNF-specific primers set up on the BDNF coding sequence (Genbank accession number AF411339) were:

BDNF 5'-TAACGGCGGCAGACAAAAAGA-3';
BDNF 5'-GAAGTATTGCTTCAGTTGGCCT-3'.

The obtained amplification product was 101 bp long.

The TrkB-specific primers were set up referring to Genbank accession number NM_006180.3 for TrkBFL, NM_001007097.1 for Trk-T-1, NM_001018066.1 for T-Shc, and NM_002507.1 for p75^{NTR}.

The primer sequences were:

TrkB 5'-CAAGACAAGGTGTTGGCCCAG-3';
TrkB 5'-CTGCTCAGGACAGAGGTTATAGC-3';
Trk-T1 5'-AACCGGTCGGGAACATCTCTC-3';
Trk-T1 5'-CCCATCCAGTGGGATCTTATG-3';
T-Shc 5'-CATCTTCTTCGGAAGGTGGCC-3';
T-Shc 5'-CGGTCTTGGGGAACTCTG-3';
p75^{NTR} 5'-TACGGCTACTACCAGGATGAGA-3';
p75^{NTR} 5'-ACCGTGTAATCCAACGGCCA-3'.

The sizes of the amplification products for TrkB, Trk-T1, T-Shc and p75^{NTR} were respectively 255 bp, 158 bp, 143 bp and 265 bp.

The primers used to determine GAPDH expression were:

GAPDH 5'-AGCTGAACGGGAAGCTCACT-3';
GAPDH 5'-AGGTCCACCCTGACACGTTG-3'.

The size of the amplified product was 67 bp.

Semi-quantitative radioactive PCR

Total RNA preparations were used for two independent RT reactions, and duplicate radioactive PCR analyses were made of each RT. The PCRs were performed in a total cDNA volume of 50 μ L consisting of 0.25 μ g of RNA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.7 μ Ci α -³²PdCTP, 0.4 μ M of each primer, and 2 U Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

BDNFIIA, IIB and IIC were amplified by means of amplification cycles consisting of an initial denaturing cycle at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of 1 minute at 94°C , 45 s at 62°C and 45 s at 72°C . The BDNFIV amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of 1 minute at 94°C , 45 s at 59°C and 45 s at 72°C .

The primers for the amplification of BDNFII mRNA were:

BDNF II: 5'-GGGCGATAGGAGTCCATTGACGAC-3';
BDNF IX (set up on BDNF coding region):
5'-CCAAGCCACCTTGTCCTCGGATG-3'.

The sizes of the amplification product for BDNF IIA, IIB and IIC were respectively 485 bp, 402 bp and 187 bp.

The primers for the amplification of BDNF IV were:

BDNF IV 5'-GCTGCAGAACAGAAGGAGTACA-3';
BDNF IXa (set up on BDNF coding region):
5'-GTCCTCATCCAACAGCTCTTCTATC-3'. The size of the amplified band was 412 bp.

The same amount of each cDNA was also independently amplified with specific primers for synaptosomal-associated protein 25 kDa (SNAP-25), a presynaptic membrane-associated protein localized in grown cones, axons and presynaptic terminals. The amplification cycles consisted of an initial denaturing cycle at 94°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C , 30 s at 57°C and 1 minute at 72°C .

The primer sequences for the amplification of SNAP-25 were:

SNAP-25: 5'-CAAATGATGCCCGAGAAAAT-3';
SNAP-25: 5'-GGAATCAGCCTTCTCCATGA-3'.

The amplification size of the obtained PCR product was 148 bp.

The PCR products were separated by means of non-denaturing 6% polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized by autoradiography.

BDNF IIA, IIB, IIC, IV and SNAP-25 mRNA levels were calculated using Quantity One software from Bio-Rad. Different exposure times were used in order to ensure that the autoradiographic bands were in the linear range of intensity.

ELISA

Three independent ELISAs were performed on three different lysates prepared from 150–200 mg of cortical and striatal tissue, with the samples being tested in triplicate in each assay. The tissue lysates were prepared in a lysis buffer consisting of glycerol 10%,

Figure 1. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels are reduced in the cortex of Huntington's disease (HD) subjects. **A.** Cortical BDNF levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). BDNF protein content was tested in triplicate in each of three independent assays, and so each column represents the mean value \pm SD of nine measurements. Control subjects, from left to right: 6182, 6142, 6002, 5959, 5936, 5919, 5077, 5074, 5021, T-168, T-111, T-274, 3688, 3888, 3746, 3899 and 3932; HD subjects, from left to right: 6051, 6121, T-289, 5576, 6010, 6183, 3176, 2866, 3723, 3484, 5570, 5507, 6062, T-128, T-291, T-178, T-260, T-310, T-329 and T-354. Statistical analyses made using the non-parametric Mann–Whitney test revealed a significant reduction in BDNF protein levels in the cortex of the HD subjects ($P < 0.05$, Mann–Whitney two-tailed test), and in the grade 2 patients compared with the 17 control subjects ($P < 0.01$, Mann–Whitney two-tailed test); Spearman's test showed that there was no progressive reduction in BDNF levels with higher disease grades. **B.**

Median BDNF protein levels in the control and HD groups (left panel), and by HD grade (right panel). The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Outliers are indicated as black circles: controls 6182 and 5936 are outliers above the 90th percentile, and control T-168 beneath the 10th percentile; the grade 3 and 4 HD patients (respectively 5576 and T-128) fell above the 90th percentile, and the grade 3 and 4 HD patients (5570 and 6062) beneath the 10th percentile. **C.** Striatal BDNF protein levels as determined by ELISA. Control subjects, from left to right: 5919, 6142, and 6182; HD subjects, from left to right: 6121, 5507 and 5570. Statistical analysis revealed a significant reduction in BDNF protein levels in the caudate of the HD subjects ($P < 0.05$, Mann–Whitney two-tailed test).

25 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, Triton $\times 100$ 1%, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA supplemented with 1:100 of Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 10 μ L of lysis buffer were used for each milligram of tissue. The frozen samples were homogenized in ice using a glass dounce homogenizer (15–20 strokes). After sonicating the tissue extract four times at 15 s pulses with the microprobe at 50%–60% output and 60% duty cycle, the samples were acidified, neutralized and centrifuged for 15 minutes at 4°C at maximum Biofuge speed. The supernatants were collected and stored in aliquots at -80°C . The BDNF measurements were made within 1 week of lysate preparation. The samples were assayed for BDNF using an ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI, USA) as described by the manufacturer. Total proteins were quantified using Bradford's method.

Statistical analyses and data representation

As BDNF and Trk values do not have a normal distribution, the non-parametric Mann–Whitney two-tailed U -test was used for the statistical analyses, with significance being set at $P < 0.05$. The correlations between disease grade or post-mortem interval (PMI) and the BDNF value were assessed using Spearman's rank correlation coefficient.

Median values were chosen because of the skewed distribution of the data. In each figure, the boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median or 50th percentile, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles.

RESULTS

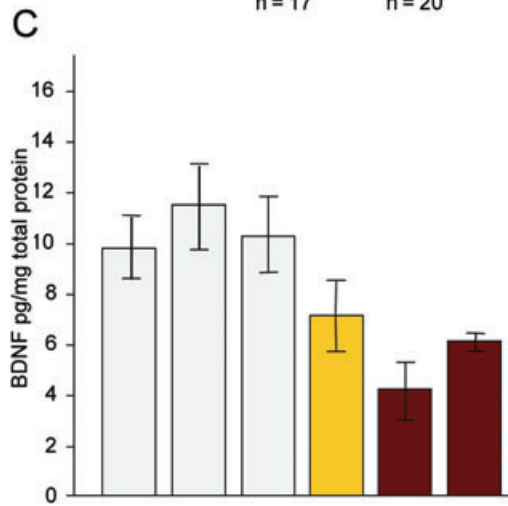
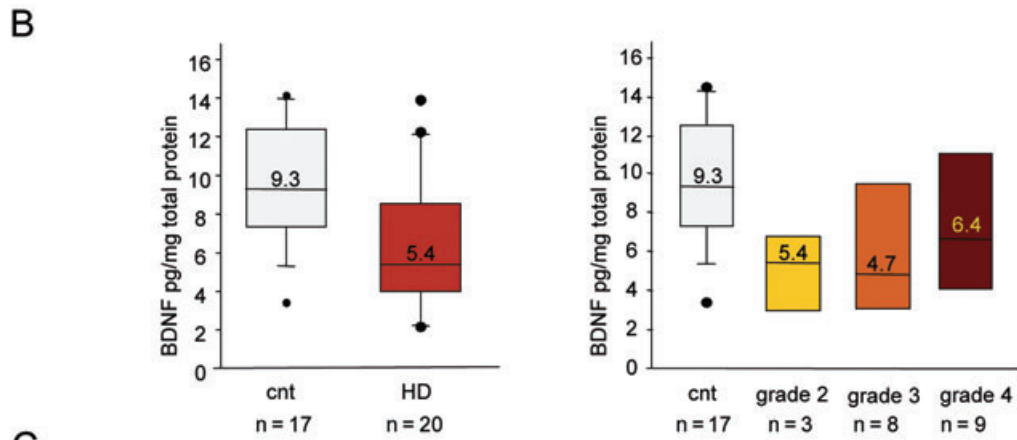
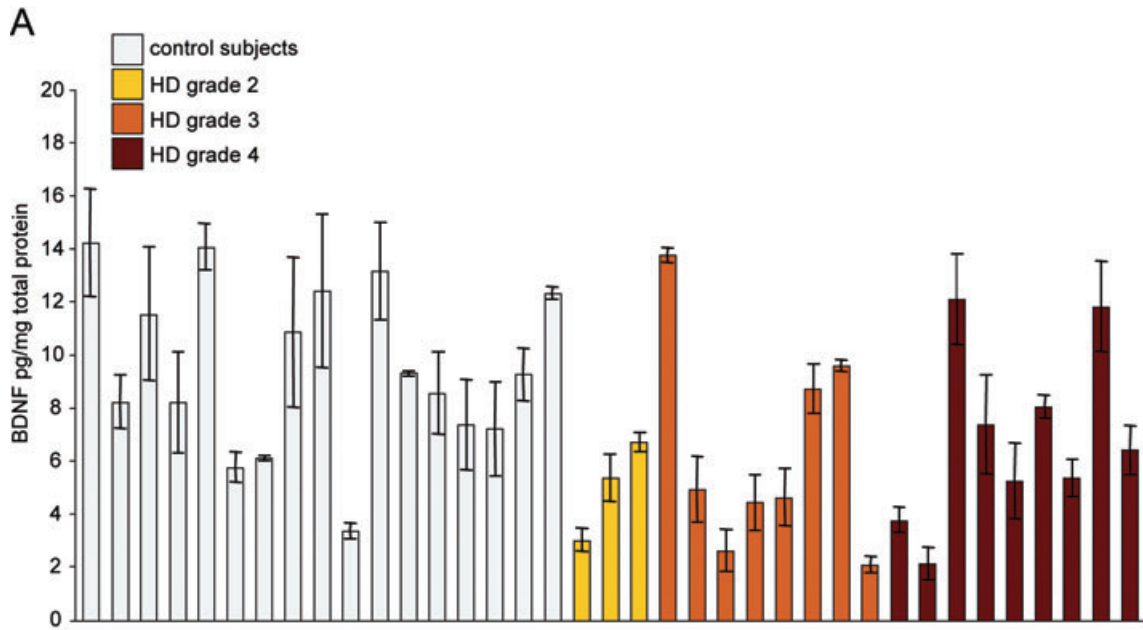
Cortical BDNF protein levels are reduced from the early symptomatic stages of HD

We prepared protein extracts from cortical specimens of 20 HD subjects (neuropathological staging Vonsattel grades 2–4) and 17 age- and gender-matched controls, and measured the level of BDNF protein by means of ELISA. Both pro-BDNF and mature BDNF can be detected by ELISA but, because of the short life of

the pro-BDNF protein, mature BDNF is always thought to be the predominant BDNF form. To maintain consistency, the analyses were limited to tissue dissected from the superior parietal lobule of the cerebral cortex (Brodmann's area 7: BA7) (Table 1).

Extraction conditions may have a significant effect on the levels of BDNF protein measured in brain tissues (28) and, in this first phase, we followed the same procedure used to extract BDNF from mouse brain (57). The tissues were homogenized with neutral extraction buffers at low salt concentrations (150 mM sodium chloride) containing moderate detergents (Triton $\times 100$ 1%), and the protein lysates were treated with acid and then neutralized in order to allow BDNF release from the vesicles, which increases BDNF recovery (28). It is critically important to remember that BDNF protein levels are significantly reduced if the samples are kept for more than 2 weeks at a temperature of -80°C (data not shown), and so we assayed the lysates within 1 week of their preparation. Figure 1A shows the BDNF protein level in each of the 17 healthy controls and 20 HD subjects, which naturally varied in the different samples: in the control group, BDNF protein content in the parietal cortex ranged from 3.4 ± 0.30 pg/mg of tissue lysate to 14.27 ± 2.04 pg/mg; the corresponding figures in the HD group were 2.1 ± 0.28 pg/mg and 13.80 ± 0.28 pg/mg. Such variable values are to be expected in post-mortem tissue. They may be related to protein degradation, which may depend on the PMI of the selected samples. However, the calculated Spearman rank correlation coefficient did not reveal any significant correlation between PMI and BDNF protein level (see Figure S1A), thus suggesting that the observed variability in BDNF content does not depend on PMI.

As most of the BDNF values in the control and HD groups did not fit a normal distribution curve, the non-parametric Mann–Whitney U -test was used to determine the statistical significance of BDNF protein content between the two cohorts. This analysis revealed that, in comparison with the 17 control subjects, BDNF protein was significantly reduced in the HD group ($P < 0.05$, two-tailed test), particularly in the three grade two patients ($P < 0.01$). The fact that there were no significant differences between the different grades suggests that, at least in our cases, there is no correlation between cortical BDNF protein levels and disease stage (as also shown by Spearman's test). As the CAG repeat length was very similar among the HD patients (see Table 1), it was not



possible to correlate BDNF levels with CAG length. Figure 1B shows median cortical BDNF protein levels in the controls and HD patients, which better represent the average value of not normally distributed data, and also reduce the skewing caused by outliers.

The ELISA-determined BDNF levels in our control human cortex samples were reasonably similar to some values previously reported by others (22, 26), but much lower than those observed in mice, which are in the range of ng/mg of protein lysate (28, 57). In the same ELISA experiments, we tested BDNF protein content in mouse cortical lysates as a control, and found levels of 5–10 ng/mg of protein lysate, thus excluding the possibility that the lower levels in human brain were caused by differences in assay sensitivity. Mouse brain tissues can be immediately processed after dissection or stored in liquid nitrogen, which is clearly not possible in the case of human post-mortem material. Protein degradation and possible differences in the activity of the enzymes controlling BDNF cleavage cannot be excluded, and may lead to an underestimate of BDNF protein content, as well as the observed and expected variability. Finally, a different protein extraction protocol may be required to ensure greater BDNF recovery, but we could not test different protocols because of the limited amount of tissue available. However, we conclude that HD subjects have significantly lower cortical BDNF protein levels than controls and, importantly, our findings show that this reduction occurs at an early symptomatic stage (grade 2).

As striatal neurons are the primary sites of degeneration in HD, and BDNF of cortical origin is vital for their survival, we measured BDNF protein in post-mortem striatum extracts from controls and HD patients (grade 3 and 4) whose cortical BDNF content had been previously analyzed. Caudate samples are the most requested by HD researchers, and therefore only very small amounts are available from brain banks. We obtained caudate tissues from eight controls and eight HD subjects, but use ELISA in the case of only three HD subjects (grades 2 and 4) and three controls (in most cases, the amount of post-mortem caudate was not enough for protein lysate preparation and subsequent ELISA). Although derived from a small number of subjects, our data show that the BDNF protein content was significantly reduced in the presence of the HD mutation ($P < 0.05$, Mann–Whitney two-tailed test; see Figure 1C), and suggest that the clearly demonstrated reduction in cortical BDNF leads to reduced striatal BDNF levels.

BDNF gene transcription is affected in the cortex of HD subjects

The human BDNF gene contains ten non-coding and one major coding exon (29, 40). Transcription is initiated at BDNF exon I, II, III, IV, V, VI, VII or IX, and the splice donor site of each of these exon sequences is spliced to the major coding exon acceptor site, thus leading to a remarkable heterogeneity in BDNF expression patterns.

To verify whether the decreased cortical levels of BDNF protein in HD subjects are caused by reduced BDNF gene transcription, total BDNF mRNA levels were evaluated in the same tissue samples as those tested by ELISA.

The RNA was extracted, and the samples were treated with DNase to eliminate genomic DNA contamination. The quality controls included spectrophotometer analyses at 260 and 280 nm

(an $A_{260}:A_{280}$ ratio of >1.8 was considered an acceptable indicator of RNA purity), and routinely performed agarose gel electrophoresis using RNA stained with ethidium bromide in order to identify ribosomal bands (28S and 18S) as an indicator of RNA integrity (see Figure S2). The quality of the mRNA in the tissue samples was also evaluated by examining the constancy of GAPDH expression, and quantitative real-time PCR experiments showed no quantitative differences in GAPDH mRNA between the HD patients and controls. Subsequently, the same cDNA samples were analyzed for their total BDNF mRNA content using primers recognizing the downstream coding exons present in all BDNF transcripts.

Figure 2A shows total BDNF mRNA levels in HD and control subjects, normalized to GAPDH mRNA content. There was no correlation between BDNF mRNA level and PMI (see Figure S1B). In line with the ELISA data, BDNF mRNA levels were significantly lower than those observed in the 17 control subjects ($P < 0.001$, Mann–Whitney two-tailed test), although the extent of the reduction did not correlate with disease stage (according to Spearman's test). Figure 2B shows the median total BDNF mRNA levels in the control and HD groups. These data confirm the reduction in cortical BDNF in the absence of a correlation between BDNF mRNA levels and disease grade, as in the case of BDNF protein levels.

Transcription from BDNF promoter exons II and IV is affected in the cortex of HD subjects

Our earlier studies of mouse models of HD have shown that wild-type but not mutant huntingtin stimulates BDNF gene transcription by acting at the level of BDNF promoter II, which contains the RE1/NRSE silencer element and whose activity is reduced by wild-type huntingtin (56, 57, 58, 59, 61). In addition, mutant huntingtin has a toxic effect and reduces transcription from BDNF exon III and IV promoters (56, 57).

We therefore tested whether BDNF gene transcription from the homolog BDNF exon II, IV and V promoters in humans is decreased in the cortex of HD subjects, concentrating on the well-characterized exon II promoter, which also contains the RE1/NRSE silencer (RE1 ID: hum26143, according to http://bioinformatics.leeds.ac.uk/RE1db_mkII/) (25), and the exon IV promoter, which contains regulatory elements that recognize calcium-responsive transcription factor, cAMP/calcium-responsive element binding proteins, and methyl-CpG binding protein 2 (12, 31, 49).

We selected samples from 10 subjects with HD (grades 3 and 4) and 10 gender- and age-matched controls, and determined their BDNF II and IV mRNA levels by means of semiquantitative radioactive reverse transcription PCR. The presence of three splice donor sites in human BDNF exon II leads to the production of the three BDNF isoforms, BDNF IIA, IIB and IIC. These were all detectable in all of the subjects, but their levels were lower in the cerebral cortex of the HD patients, thus suggesting that transcription from BDNF promoter exon II is affected in HD (Figure 3A). SNAP-25, which is involved in neurotransmitter exocytosis in neurons, was amplified as a housekeeping gene. A previous study has found reduced SNAP-25 mRNA levels in the prefrontal association cortex of HD subjects (23), but the levels were unaffected in our parietal cortex specimens. We then quantitatively evaluated

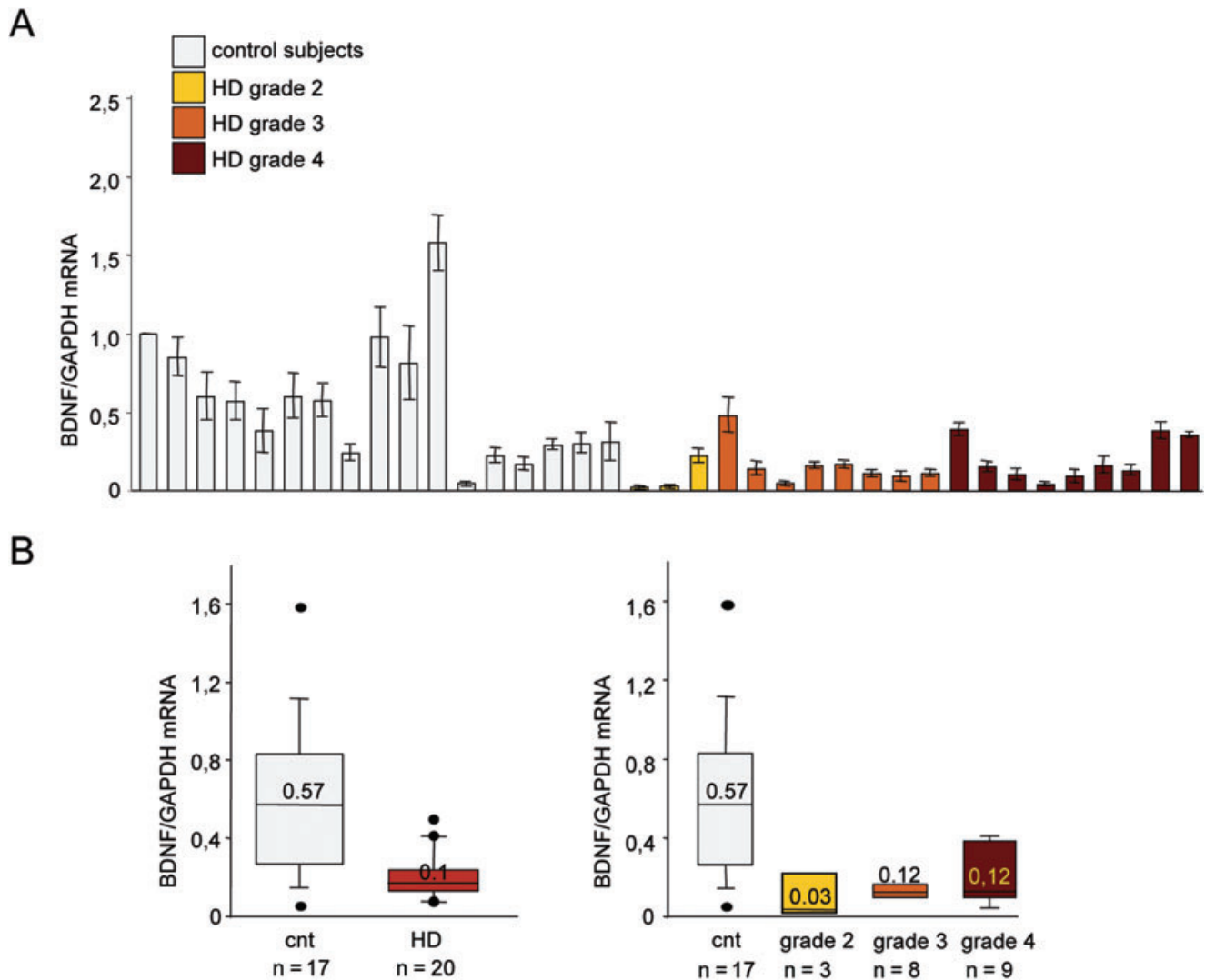


Figure 2. Total brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA levels are reduced in the cortex of Huntington’s disease (HD) subjects. **A.** Total BDNF mRNA levels were determined by means of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and normalized to the level of GAPDH mRNA. The values are the averages \pm SD of six independent PCR experiments. Control subjects, from left to right: T-274, 6182, 6142, 6002, 5959, 5936, 5919, 5077, 5074, 5021, T-168, T-111, 3688, 3888, 3746, 3899 and 3932; HD subjects, from left to right: 6051, 6121, T-289, 5576, 6010, 6183, 3176, 2866, 3723, 3484, 5570, 5507, 6062, T-128, T-291, T-178, T-260, T-310, T-329 and T-354. BDNF mRNA levels were significantly reduced in the cortex of the HD subjects ($P < 0.001$, Mann–Whitney two-tailed test), but did not significantly decrease with increas-

ing disease grade (Spearman’s test). **B.** Left panel: median BDNF mRNA levels in the control and HD groups. Right panel: median BDNF mRNA levels at different disease stages. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. When 10 or more samples were analyzed, whiskers above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. Outliers are indicated as black circles. Left panel: control T-168 fell above the 90th percentile, and control T-111 beneath the 10th percentile. The grade 3 and 4 HD patients (respectively 5576 and 5507) fell above the 90th percentile, and the grade 2 patients 6051 and 6121 fell beneath the 10th percentile.

BDNF II mRNA content in four independent PCR reactions, densitometrically analyzed the three amplified BDNF isoforms and the SNAP-25 band, and determined the ratio between the sum of the absolute values of BDNF II and SNAP-25 mRNA in each sample. BDNF II mRNA levels were significantly reduced in the HD patients ($P < 0.01$, Mann–Whitney two-tailed test), with no significant difference between the grade 3 and grade 4 patients. Similar results were obtained when BDNF II mRNA was normalized over

GAPDH content (data not shown). Figure 3B (left panel) shows the median BDNF II mRNA levels in the control and HD subjects.

Figure 3A shows that BDNF IV mRNA levels were also lower in the HD subjects than in the controls ($P < 0.01$, Mann–Whitney two-tailed test). Similar results were obtained when BDNF IV mRNA was normalized over GAPDH content (data not shown). Figure 3B (right panel) shows the median BDNF IV mRNA levels in the controls and HD patients.

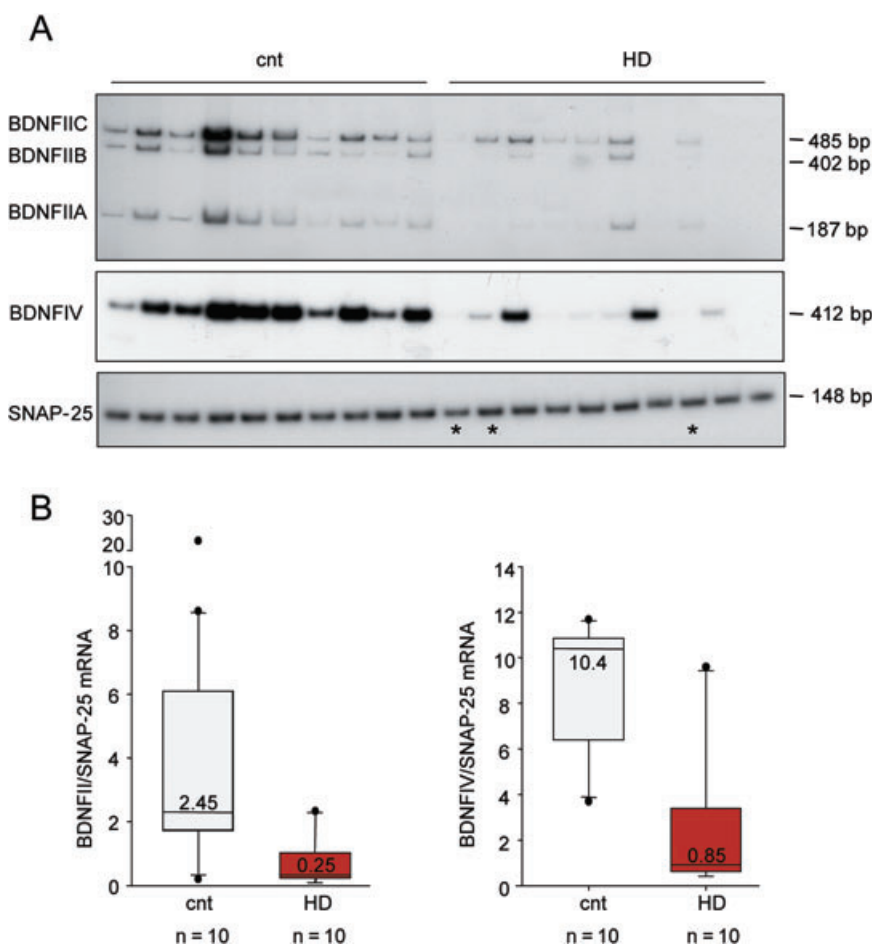


Figure 3. Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) isoforms in the cortex of Huntington's disease (HD) subjects.

A. BDNF II and IV mRNA levels were determined by means of semiquantitative radioactive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in 10 controls and 10 subjects with grade 3 ($n = 7$) and 4 HD ($n = 3$) (* indicates grade 4 subjects). The presence of three splice donor sites in human BDNF exon II leads to the production of three BDNF isoforms: BDNF mRNA IIA, IIB and IIC. Synaptosome-associated protein 25 kDa (SNAP-25) was amplified as a housekeeping gene in addition to GAPDH (data not shown). The data come from one of four independent PCR experiments. Control subjects, from left to right: T-274, 6182, 6142, 6002, 5959, 5936, 5919, 5077, 5074 and 5021; HD subjects, from left to right: T-291, T-310, 3176, 2866, 3723, 3484, 5570, 6062, 6010 and 6183.

B. Quantification of BDNF II (left panel) and IV mRNA (right panel). Each of the amplified bands was densitometrically analyzed, and the BDNF level expressed as an absolute value normalized to the absolute value of SNAP-25. The data were calculated from four independent PCR experiments. BDNF II and IV mRNA were significantly reduced in the HD patients ($P < 0.01$, Mann-Whitney two-tailed test). BDNF mRNA levels are shown as the median value within each group. Similar results were obtained when the data were normalized to GAPDH content. Outliers are indicated as black circles. Left panel: control patients 6182 and 6002 fell above the 90th percentile, and control 5919 beneath the 10th percentile. Grade 3 HD patient 3484 fell above the 90th percentile. Right panel: control patient 6002 fell above the 90th percentile, and control T-274 beneath the 10th percentile. Grade 3 HD patient 3176 fell above the 90th percentile.

Trk B and p75^{NTR} mRNA levels in the brain of HD subjects

Cortical BDNF is released at the axon terminals and captured by striatal neurons after binding to TrkB receptor tyrosine kinase (3, 8, 35). Although most of the functions attributed to BDNF are associated with full-length TrkB, the brain also contains two truncated isoforms that lack a large part of the intracellular domain (Trk-T1 and Trk-T2) and do not show any protein tyrosine kinase activity (8, 32, 35). The suggested roles of truncated receptors include growth and development, and the negative modulation of TrkB expression and function (thus decreasing BDNF-mediated signaling). They can also regulate BDNF storage and release by glial cells (8). A novel truncated Trk isoform that is preferentially expressed in neurons and localized on the plasma membrane has been identified more recently, which lacks the tyrosine kinase domain but has an Shc binding site and is therefore known as

T-Shc (20, 47). In addition, BDNF binds to the p75^{NTR}, which is mainly expressed during early neuronal development, but may be re-expressed in adult brain under various pathological conditions (13).

In order to investigate the role of TrkB in HD, we evaluated its levels, and those of the highly expressed truncated Trk-T1 and T-Shc isoforms in the caudate nucleus and cerebral cortex of eight subjects with HD (grades 2, 3 and 4) and eight age-matched controls. As a previous study of four cortical and striatal specimens taken from HD subjects (18) found a reduction in TrkB protein levels, we used quantitative real-time PCR to investigate whether this reduction may be caused by decreased TrkB mRNA levels.

Despite the expected variability in the control and HD populations, Figure 4A shows that the levels of full-length TrkB mRNA normalized to GAPDH content were significantly lower in the caudate nucleus, but not in the cerebral cortex of the HD patients ($P < 0.01$, Mann-Whitney two-tailed test).

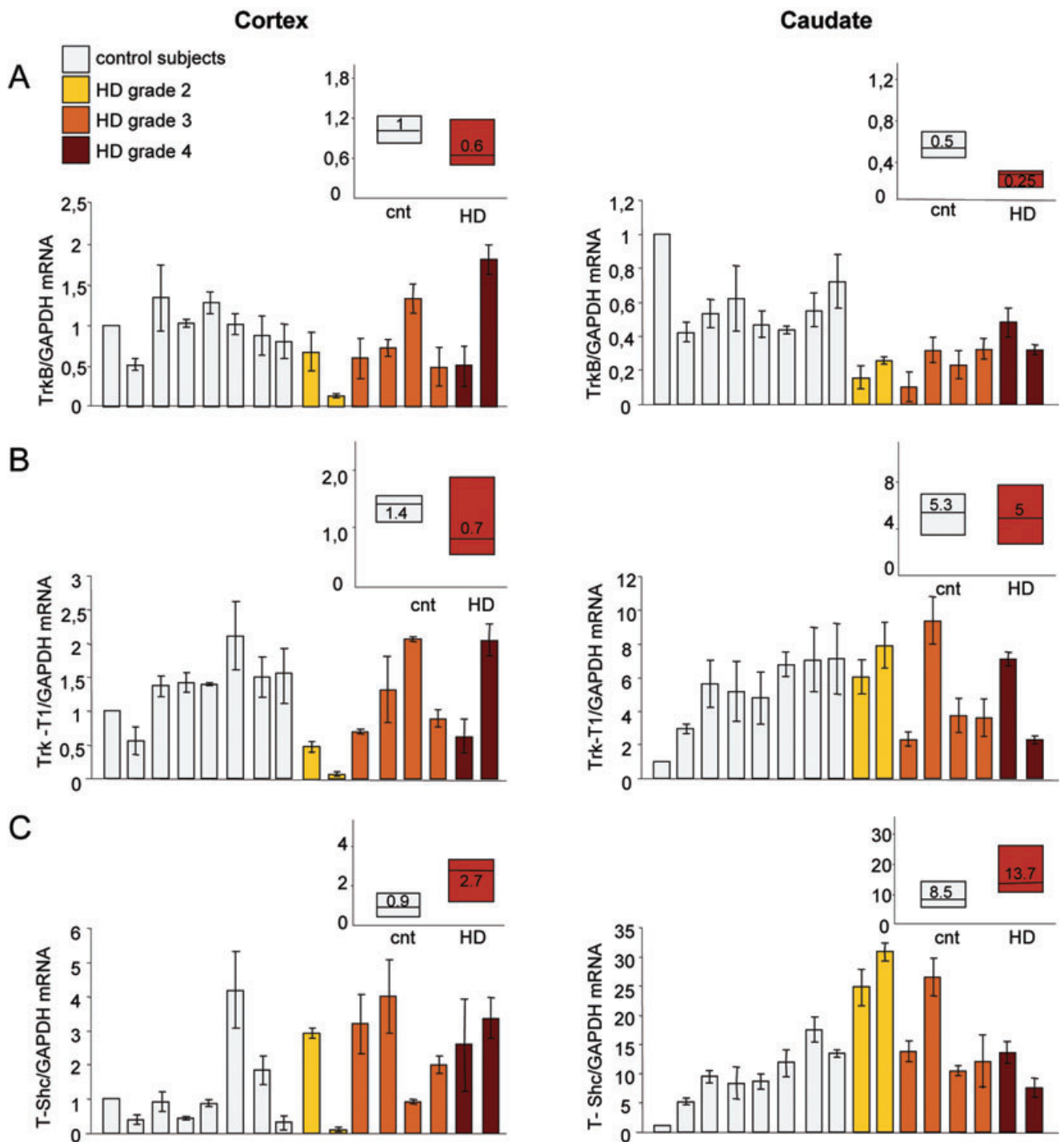


Figure 4. BDNF receptors mRNA levels in the cortex and caudate of Huntington's disease (HD) subjects. TrkB, Trk-T1 and T-Shc mRNA levels were determined by means of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) in the cortex and caudate of eight controls and eight HD subjects. Trk mRNA was normalized to the level of GAPDH mRNA. The values are the averages \pm SD of six independent PCR experiments. Control subjects, from left to right: 6182, 6142, 6002, 5959, 5936, 5919, 5074 and 5021; HD subjects, from left to right: 6051, 6121, 5570, 5576, 6010, 6183, 5507 and 6062. **A.** TrkB mRNA levels were significantly reduced in the caudate of the HD subjects ($P < 0.01$, Mann-Whitney

two-tailed test), but not in the cortex. The decreased levels did not correlate with disease grade (Spearman's test). **B.** The levels of Trk-T1 mRNA were not significantly lower in the cortex or caudate of the HD subjects. **C.** T-Shc mRNA levels were significantly increased in the cortex and caudate of the HD subjects ($P < 0.05$, Mann-Whitney two-tailed test). **A, B** and **C** respectively show median TrkB, Trk-T1 and T-Shc mRNA levels in the control and HD subjects. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile.

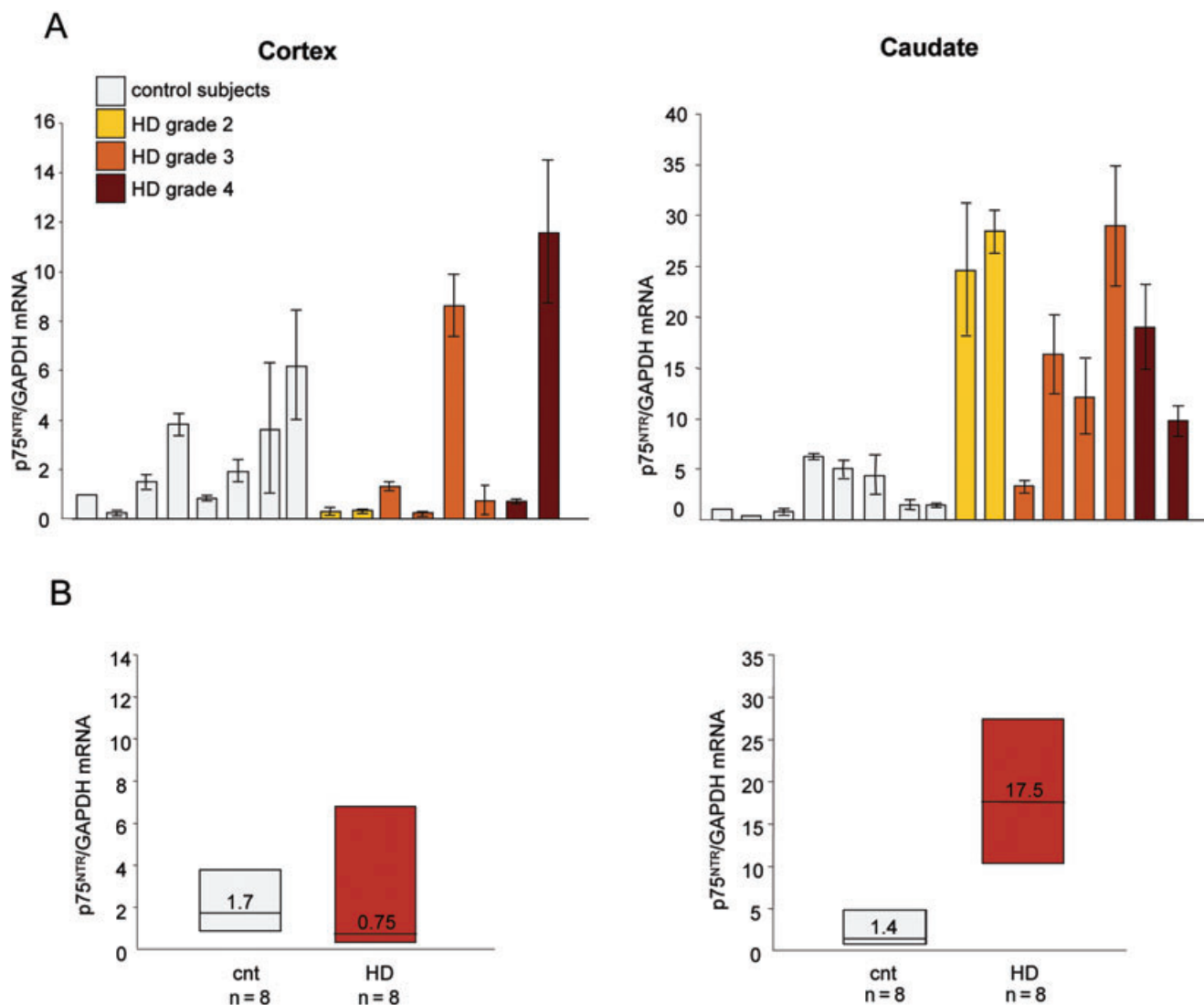


Figure 5. p75 pan-neurotrophin receptor (p75^{NTR}) mRNA levels in the cortex and caudate of Huntington’s disease (HD) subjects. **A.** p75^{NTR} mRNA levels were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) in the cortex and caudate of the eight controls and eight HD subjects shown in Figure 4, and normalized to the level of GAPDH mRNA. The values are the averages ± SD of six independent

PCR experiments. p75^{NTR} mRNA levels were significantly higher in the caudate of the HD patients ($P < 0.01$, Mann–Whitney two-tailed test), but not in the cerebral cortex. **B.** Median p75^{NTR} mRNA level in control and HD subjects. The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile.

The levels of truncated Trk-T1 receptors in HD caudate nucleus and cortex were unaltered (Figure 4B), but there was a significant increase in T-Shc mRNA in both brain areas ($P < 0.05$, Mann–Whitney two-tailed test) (Figure 4C). *In vitro* cell line studies have shown that the transport of TrkB to the cell membrane is influenced by interactions between T-Shc and TrkB (20), and so the increased levels of T-Shc in the caudate may reflect an attempt to relocalize functional TrkB to the plasma membrane and/or indicate additional defects in TrkB signaling insofar as it is known that T-Shc can negatively modulate TrkB function (20, 47).

Finally, we assessed p75^{NTR} mRNA levels in the same tissues and, as shown in Figure 5A, found that they were significantly

increased in the caudate of the HD subjects ($P < 0.01$, Mann–Whitney two-tailed test). There were no differences in the cortical specimens of the HD and control subjects, thus suggesting that the increased level of p75^{NTR} mRNA may be specific to the caudate. Figure 5B shows the median cortical and striatal p75^{NTR} mRNA levels in the controls and HD patients.

DISCUSSION

We report reduced BDNF protein levels in the largest collection of post-mortem samples of human cerebral cortices so far analyzed,

and a reduction in total BDNF mRNA levels due to decreased transcription by BDNF exon II and exon IV promoters.

These findings are consistent with the large amount of data obtained from various mouse models of the disease (56) showing a reproducible and progressive reduction in cortical BDNF mRNA and protein levels (59). In our human samples, we found that the level of cortical BDNF is reduced from the early symptomatic stage of HD, but did not seem to correlate with disease progression.

Analysis of the potential correlation between BDNF levels and CAG length was precluded by the over-similarity of the CAG repeat sizes in this study. The only published data concerning such a correlation comes from an *in vitro* study showing that cells transfected with an huntingtin exon 1 cDNA construct bearing 47 or 72 CAG repeats led to a similar reduction in BDNF content (10).

We also found that cortical BDNF levels vary within the normal and HD population. We first associated this variability with between-subject differences in the PMI, but these did not affect the statistical outcome of a significant reduction in BDNF levels in subjects with HD.

Previously published data indicate that differences in BDNF protein and mRNA levels may be caused by individual variations in life style. BDNF levels significantly increase in mice on regimens of dietary restriction (14) or physical exercise favored by environmental enrichment (46). Moreover, BDNF expression undergoes diurnal oscillations (9). Animal models have also shown that antidepressants affect BDNF gene transcription in brain (11) in an exon- and tissue-specific manner. In particular, selective serotoninergic or noradrenergic reuptake inhibitors increase BDNF mRNA in different brain areas, whereas neuroleptics and antipsychotic drugs down-regulate BDNF gene transcription (4, 5, 11). As HD patients are normally exposed to these drugs, some of the variability may have been caused by the drugs taken by the individual subjects but, as no data are available concerning the drugs administered to the cases examined in this study, we could not seek any correlation with pharmacological treatments.

On the basis of many previous animal studies and our new human data, we conclude that reduced BDNF promoter activity in human cortex is a feature of HD, and reduces the amount of BDNF produced in the cortex and transported from the cortex to the striatum. It is important to note that this occurs from the early symptomatic stages, thus suggesting that there may be a large window for therapeutic interventions aimed at restoring BDNF levels (56, 59, 60).

Our findings differ from those of an early study showing unaltered BDNF protein levels in the cortex and reduced BDNF levels in the striatum of four subjects with HD compared with six age-matched control subjects (15) and, more recently, Gauthier *et al* observed reduced BDNF protein levels in the striatum, but not in the cerebral cortex of ten HD subjects and seven age-matched controls. On the basis of these findings and *in vitro* experiments showing reduced BDNF vesicle transport in HD cells, it has been suggested that the lower BDNF levels in the striatum may also be caused by reduced transport from the cerebral cortex to striatal targets (16). However, it is likely that the differences in the results are caused by the diversity of the considered samples and the different methods of analyzing BDNF protein. Most strikingly, we observed considerable between-sample variability that was not found by Gauthier *et al*, probably because they studied a more homogenous collection of tissue specimens. Ferrer and Gauthier

determined BDNF protein levels by means of Western blotting, which exclusively detects mature BDNF, but is less sensitive and has less quantitative power than ELISA. As our study uses ELISA, which measures both the mature and pro-BDNF, it is possible that the lower levels of cortical BDNF protein may be caused by reductions in both forms, although we think the latter represents a very minor fraction as its half-life is very short because of its fast processing to mature BDNF. Finally, it is worth noting that our finding of reduced cortical BDNF mRNA and protein levels does not exclude the hypothesis of impaired vesicle trafficking along the cortical afferents, and both could contribute to reducing the delivery of BDNF to striatal neurons.

Given the extensive evidence linking BDNF to HD, the BDNF gene has been tested as a potential modifier of age at HD onset caused by the presence of the BDNF Val66Met polymorphism influencing BDNF vesicle transport (56) but, despite an initial report of a correlation (1), subsequent studies have failed to reveal any significant effect (56). As the Val66Met polymorphism affects BDNF transport from the Golgi region to appropriate secretory granules, and not its transcription or biological activity, it is possible that the lack of an association indicates that the defect in BDNF transport has no impact on age at disease onset, although it may still have an effect on disease progression. The possibility that a defect in BDNF transcriptional activity is present pre-symptomatically and may therefore affect age at onset and/or disease progression remains open.

Taken together, our data suggest that strategies aimed at increasing striatal BDNF levels may be beneficial in HD (56, 60). However, whether or how a neuron responds will depend on the expression of its high affinity TrkB receptor. We found that the levels of TrkB mRNA (which activates the intracellular signaling pathways leading to cell survival and differentiation following BDNF binding) are significantly decreased in the caudate but not in the cortex of HD subjects. On the contrary, the mRNA levels of Trk-T1 (a truncated TrkB isoform highly expressed in the brain) were not significantly affected in either the cortical or striatal specimens, which is in line with the findings of previous studies of other pathological conditions (48). We also found that T-Shc mRNA levels were increased in both the cortex and the caudate of HD subjects. This last receptor, which is mainly expressed in neurons and preferentially located on the plasma membrane, can be involved in TrkB localization on the plasma membrane, but can also act as a negative regulator of TrkB signaling in the brain (20–47), and so increased T-Shc mRNA indicates a receptor imbalance. More recent findings indicate that unprocessed neurotrophin can bind to p75^{NTR}, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. Pro-BDNF binding to p75^{NTR} is linked to several intracellular signal transduction pathways that mediates biological actions other than those of the Trk receptors, and p75^{NTR} is involved in events promoting cell migration, differentiation and axon growth (13, 41). A number of reports indicate that its expression is dramatically increased under neurodegenerative conditions: for example, increased p75^{NTR} levels have been found in the basal nucleus of patients with Alzheimer's disease or temporal lobe epilepsy (19, 37). In line with this, our data showing that p75^{NTR} mRNA levels are increased in the caudate but not the cortex of HD subjects reflect what is known in other neurodegenerative diseases. It has also been reported that p75^{NTR} binds pro-BDNF (an immature form of the neurotrophin), recruits sortilin co-receptors and

leads to apoptosis (50). This suggests that higher p75^{NTR} levels may increase apoptotic cell death in a diseased brain. As p75^{NTR} is highly expressed in glial cells (37), we hypothesize that increased levels of striatal p75^{NTR} may be associated with the reactive gliosis often found in neurodegenerative diseases.

In conclusion, our data indicate that there is a clear reduction in BDNF mRNA and protein levels in the cortex of subjects with HD, thus suggesting that the administration of BDNF may be beneficial. In line with this, it has been shown that depleted BDNF in HD transgenic mice worsens the phenotype, whereas BDNF administration improves the neuropathological and behavioral phenotype (10). Although our finding that TrkB, T-Shc and p75^{NTR} levels were severely affected in the same specimens is a warning that BDNF administration alone may not be sufficient, it is known to benefit mice with decreased striatum levels of TrkB receptor (10). This suggests that BDNF may have a neuroprotective function even in the presence of lower levels of TrkB, or that the activation of a limited amount of TrkB may be enough to improve the behavioral phenotype in mice.

We believe that our results strongly support beginning a systematic effort to evaluate the impact of increasing BDNF levels in HD mice (56). The discovery that RE1/NRSE is a target of normal huntingtin function on the BDNF promoter, and the elucidation of the mechanism through which this protein stimulates BDNF gene transcription (60, 61), have led to the development of a cell-based drug screening system and the identification of small molecules capable of increasing endogenous BDNF production in HD cells and the transcription from other RE1/NRSE neuronal genes (43). It is hoped that small molecules capable of passing the blood-brain barrier and activating BDNF and RE1/NRSE-controlled gene transcription will become available in the future and prove useful in HD.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Professor Alberto Clivio, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, University of Milan, for his generous hospitality and collaboration, and to Cinzia Gellera and Caterina Mariotti, Besta Neurological Institute, Milan, for their help in determining CAG size.

This study was funded by grants from the Huntington's Disease Society of America Coalition for the Cure (USA), High Q Foundation (USA), Telethon (Italy), Fondazione Cariplo (Italy), Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (Italy), NeuroNE (European Union's 6th Framework Programme), to E. Cattaneo. E. Cattaneo and M.E. MacDonald are members of the Huntington Function Team, Coalition for the Cure (Huntington's Disease Society of America).

REFERENCES

- Alberch J, Lopez M, Badenas C, Carrasco JL, Mila M, Munoz E, Canals JM (2005) Association between BDNF val66met polymorphism and age at onset in Huntington disease. *Neurology* **65**:964–965.
- Alcantara S, Frisen J, del Rio JA, Soriano E, Barbacid M, Silos-Santiago I (1997) TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. *J Neurosci* **17**:3623–3633.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL *et al* (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* **389**:856–860.
- Angelucci F, Aloe L, Iannitelli A, Gruber SH, Mathe AA (2005) Effect of chronic olanzapine treatment on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* **15**:311–317.
- Bai O, Chlan-Fourney J, Bowen R, Keegan D, Li XM (2003) Expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus after treatment with antipsychotic drugs. *J Neurosci Res* **71**:127–131.
- Baquet ZC, Gorski JA, Jones KR (2004) Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **24**:4250–4258.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* **1**:549–553.
- Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* **22**:123–131.
- Bova R, Micheli MR, Qualadrucci P, Zucconi GG (1998) BDNF and trkB mRNAs oscillate in rat brain during the light-dark cycle. *Brain Res Mol Brain Res* **57**:321–324.
- Canals JM, Pineda JR, Torres-Peraza JF, Bosch M, Martin-Ibanez R, Munoz MT *et al* (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* **24**:7727–7739.
- Castren E, Voikar V, Rantamaki T (2007) Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* **7**:18–21.
- Chen WG, West AE, Tao X, Corfas G, Szentirmay MN, Sawadogo M *et al* (2003) Upstream stimulatory factors are mediators of Ca²⁺-responsive transcription in neurons. *J Neurosci* **23**:2572–2581.
- Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* **5**:1131–1136.
- Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Li XJ, Mattson MP (2003) Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:2911–2916.
- Ferrer I, Goutan E, Marin C, Rey MJ, Ribalta T (2000) Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res* **866**:257–261.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP *et al* (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**:127–138.
- Gellera C, Meoni C, Castellotti B, Zappacosta B, Girotti F, Taroni F, DiDonato S (1996) Errors in Huntington disease diagnostic test caused by trinucleotide deletion in the IT15 gene. *Am J Hum Genet* **59**:475–477.
- Gines S, Bosch M, Marco S, Gavaldà N, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ *et al* (2006) Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *Eur J Neurosci* **23**:649–658.
- Ginsberg SD, Che S, Wu J, Counts SE, Mufson EJ (2006) Down regulation of trk but not p75NTR gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **97**:475–487.
- Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Akerman KE, Stoilov P, Stamm S *et al* (2002) Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem* **277**:43160–43167.

21. Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE *et al* (2004) Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* **11**:424–438.
22. Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U (2000) Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* **57**:846–851.
23. Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, Kuhn A, Sengstag T, Hughes G *et al* (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* **15**:965–977.
24. Ivkovic S, Ehrlich ME (1999) Expression of the striatal DARPP-32/ARPP-21 phenotype in GABAergic neurons requires neurotrophins in vivo and in vitro. *J Neurosci* **19**:5409–5419.
25. Johnson R, Gambelin RJ, Ooi L, Bruce AW, Donaldson IJ, Westhead DR *et al* (2006) Identification of the REST regulon reveals extensive transposable element-mediated binding site duplication. *Nucleic Acids Res* **34**:3862–3877.
26. Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R (2005) Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res* **136**:29–37.
27. Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem* **69**:34–42.
28. Kolbeck R, Bartke I, Eberle W, Barde YA (1999) Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin gene mutant mice. *J Neurochem* **72**:1930–1938.
29. Liu QR, Walther D, Drgon T, Poleskaya O, Lesnick TG, Strain KJ *et al* (2005) Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **134**:93–103.
30. Martinez-Serrano A, Bjorklund A (1996) Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells. *J Neurosci* **16**:4604–4616.
31. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y *et al* (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* **302**:890–893.
32. Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T (1991) trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* **11**:143–153.
33. Mizuno K, Carnahan J, Nawa H (1994) Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev Biol* **165**:243–256.
34. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **63**:71–124.
35. Nagappan G, Lu B (2005) Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* **28**:464–471.
36. Nakao N, Brundin P, Funa K, Lindvall O, Odin P (1995) Trophic and protective actions of brain-derived neurotrophic factor on striatal DARPP-32-containing neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* **90**:92–101.
37. Ozbas-Gerceker F, Gorter JA, Redeker S, Ramkema M, van der Valk P, Baayen JC *et al* (2004) Neurotrophin receptor immunoreactivity in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* **30**:651–664.
38. Perez-Navarro E, Alberch J, Neveu I, Arenas E (1999) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo. *Neuroscience* **91**:1257–1264.
39. Perez-Navarro E, Canudas AM, Akerund P, Alberch J, Arenas E (2000) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurochem* **75**:2190–2199.
40. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T (2007) Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* **90**:397–406.
41. Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**:1545–1564.
42. Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:5733–5737.
43. Rigamonti D, Bolognini D, Mutti C, Zuccato C, Tartari M, Sola F *et al* (2007) Loss of huntingtin function complemented by small molecules acting as RE1/NRSE silencer modulators. *J Biol Chem* **282**:24554–24562.
44. Rosas HD, Koroshetz WJ, Chen YI, Skeuse C, Vangel M, Cudkowicz ME *et al* (2003) Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* **60**:1615–1620.
45. Rosas HD, Hevelone ND, Zaleta AK, Greve DN, Salat DH, Fischl B (2005) Regional cortical thinning in preclinical Huntington disease and its relationship to cognition. *Neurology* **65**:745–747.
46. Spires TL, Grote HE, Varshney NK, Cordery PM, van Dellen A, Blakemore C, Hannan AJ (2004) Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci* **24**:2270–2276.
47. Stoilov P, Castren E, Stamm S (2002) Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **290**:1054–1065.
48. Tan J, Shepherd RK (2006) Aminoglycoside-induced degeneration of adult spiral ganglion neurons involves differential modulation of tyrosine kinase B and p75 neurotrophin receptor signaling. *Am J Pathol* **169**:528–543.
49. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* **20**:709–726.
50. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD *et al* (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* **25**:5455–5463.
51. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**:971–983.
52. Trotter Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An I, Lutz Y *et al* (1995) Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet* **10**:104–110.
53. Ventimiglia R, Mather PE, Jones BE, Lindsay RM (1995) The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* **7**:213–222.
54. Widmer HR, Hefti F (1994) Neurotrophin-4/5 promotes survival and differentiation of rat striatal neurons developing in culture. *Eur J Neurosci* **6**:1669–1679.
55. Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P *et al* (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* **33**:849–860.
56. Zuccato C, Cattaneo E (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* **81**:294–330.

57. Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L *et al* (2001) Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's disease. *Science* **293**:493–498.
58. Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L *et al* (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* **35**:76–83.
59. Zuccato C, Liber D, Ramos C, Tarditi A, Rigamonti D, Tartari M *et al* (2005) Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res* **52**:133–139.
60. Zuccato C, Tartari M, Goffredo D, Cattaneo E, Rigamonti D (2005) From target identification to drug screening assays for neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res* **52**:245–251.
61. Zuccato C, Belyaev N, Conforti P, Ooi L, Tartari M, Papadimou E *et al* (2007) Widespread disruption of REST/NRSF occupancy of its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci* **27**:6972–6983.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The following supplementary material is available for this article online:

Figure S1. Correlation between post-mortem interval (PMI) and (A) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and (B) mRNA level in control and Huntington's disease patients. No correlation between BDNF level and PMI was observed, according to Spearman test.

Figure S2. A selection of RNA used in this study.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>