



SAPIENZA
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA
SPERIMENTALE
XXXII CICLO**

*“Microglia e Sistema Endocannabinoide: ruolo di URB597 in un modello
in vitro di neuroinfiammazione”*

DOTTORANDO
Maria Giovanna De Caris

DOCENTE GUIDA
Prof.ssa Patrizia Mancini

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

INDICE

Abstract	4
Introduzione	7
1. Neuroinfiammazione.....	7
2. Malattie neurodegenerative.....	8
3. Cellule della microglia.....	9
4. Microglia e malattia di Alzheimer.....	13
5. Terapia farmacologica della malattia di Alzheimer.....	20
6. Sistema Endocannabinoide.....	22
7. Endocannabinoidi.....	23
8. Recettori degli endocannabinoidi.....	25
9. Endocannabinoidi e malattia di Alzheimer.....	27
10. Inibitori del sistema endocannabinoide: URB597.....	29
Materiali e metodi	31
1. Colture cellulari.....	31
2. Trattamenti.....	31
3. Saggio per l'attività enzimatica di FAAH.....	32
4. Saggio MTT.....	33
5. Immunofluorescenza.....	34
6. Analisi di western blot.....	36
7. Saggio pull down.....	37

8. Saggio di migrazione cellulare.....	37
9. Analisi con FITC-destrano.....	38
10. Real-time PCR quantitativa.....	39
11. Analisi statistica.....	40
Risultati	41
1. A β non influenza l'attività dell'enzima FAAH.....	41
2. URB597 non mostra effetti citotossici in cellule BV-2.....	43
3. URB597 in combinazione con A β non influenza l'attività mitocondriale di cellule BV-2.....	45
4. URB597 reverte le variazioni morfologiche di A β	47
5. URB597 favorisce l'attivazione della GTPasi Cdc42.....	50
6. URB597 riduce la migrazione microgliale.....	55
7. URB597 aumenta la capacità fagocitica microgliale.....	57
8. URB597 e A β inducono up-regolazione della proteina Iba1.....	60
9. URB597 riduce l'espressione di iNOS inducendo quella di Arg- 1.....	62
10. URB597 riduce l'espressione degli mRNA per IL-1 β e TNF- α aumentando quella per TGF- β e IL-10.....	64
Discussione	66
Bibliografia	71

ABSTRACT

La microglia costituisce la prima linea di difesa contro i danni del SNC. Le cellule della microglia sono cellule immunocompetenti che mantengono l'omeostasi cerebrale, garantiscono e controllano il trofismo neuronale. In condizioni fisiologiche la microglia a riposo presenta, a livello morfologico, un soma ristretto e lunghe ramificazioni dinamiche, che agiscono da sentinelle del microambiente circostante. In presenza di uno stimolo lesivo, invece, va incontro ad una rapida attivazione con modificazioni sia a livello morfologico che funzionale. Esistono diversi fenotipi di attivazione della microglia: il fenotipo M1 classico, pro-infiammatorio, e il fenotipo M2 alternativo, anti-infiammatorio. Nella malattia di Alzheimer la deposizione del peptide beta-amiloide (A β) determina uno stato di infiammazione cronica, che promuove l'attivazione e il reclutamento della microglia. Diversi studi sperimentali hanno dimostrato come il sistema endocannabinoide sia in grado di contrastare il processo neurodegenerativo e quindi avere un ruolo protettivo nella patogenesi della patologia di Alzheimer, aprendo un nuovo scenario su possibili strategie terapeutiche per questa devastante malattia. Questo progetto ha come scopo lo studio dell'influenza di URB597, un ben noto inibitore dell'enzima FAAH, sull'attivazione delle cellule gliali, in particolare sulla morfologia e sul rilascio di mediatori infiammatori in cellule di microglia murina BV-2. A tale scopo, le cellule sono state caratterizzate sia morfologicamente che funzionalmente. Inizialmente è stata valutata la vitalità cellulare per definire la concentrazione di URB597 da usare nei saggi sperimentali, e, una volta definita la concentrazione ottimale, si è proceduto a determinare la vitalità cellulare nelle cellule BV-2 trattate con A β in

presenza o assenza di URB597. I dati ottenuti hanno mostrato che la stimolazione con la sola A β determina una significativa riduzione della vitalità rispetto al controllo, che non viene contrastata da URB597, suggerendo la non citotossicità dell'inibitore.

Sono stati esaminati i cambiamenti morfologici, sinonimo di attivazione microgliale, attraverso analisi del citoscheletro di actina mediante microscopia a fluorescenza. I risultati hanno mostrato come URB597 sia in grado di revertire il fenotipo ameboide, tipico dell'attivazione microgliale. Dal momento che la plasticità cellulare è regolata dal citoscheletro di actina attraverso le proteine della famiglia Rho GTPasi, sono stati valutati i livelli di espressione e lo stato di attivazione delle proteine Rho, Rac e Cdc42, mediante analisi di western blot e saggio di pull down. Le analisi dei western blot indicano che i livelli delle proteine Rho, Rac e Cdc42 non presentano nessuna alterazione. Nonostante non siano visibili cambiamenti nei livelli di espressione di queste proteine, è risultata evidente una up-regolazione dell'attività della proteina Cdc42, molecola coinvolta in processi fisiologici come motilità e fagocitosi. Quindi, è stato valutato l'effetto di URB597 nelle cellule BV-2 trattate con o senza A β , sulla migrazione e sulla fagocitosi, caratteristiche, rispettivamente, dei fenotipi di attivazione M1 e M2. I risultati ottenuti hanno dimostrato che URB597, quando somministrato insieme ad A β , è in grado di ridurre la migrazione e di aumentare il numero di cellule in fagocitosi. Per confermare l'attivazione delle cellule BV-2 dopo l'insulto con A β , sono stati condotti esperimenti atti a valutare i marcatori di attivazione microgliale, come Iba1, e i marcatori specifici di polarizzazione M1/M2: iNOS e Arg-1, mediante microscopia a fluorescenza. I risultati hanno mostrato una up-regolazione del marcatore Iba1 sia dopo

trattamento con URB597 e A β da soli, che nel trattamento combinato, indicando attivazione microgliale. Inoltre, URB597, in trattamento combinato con A β , sembra ridurre l'espressione di iNOS inducendo, da solo, quella di Arg-1. Poichè l'attivazione della microglia è accompagnata dal rilascio di citochine pro-infiammatorie, è stata valutata la loro espressione nelle cellule BV-2, trattate come già descritto, mediante analisi di q-PCR. I risultati hanno mostrato che URB597, in trattamento combinato con A β , ha ridotto significativamente l'espressione dell'mRNA per le citochine pro-infiammatorie TNF- α e IL-1 β , e, da solo, ha aumentato quella per le citochine anti-infiammatorie TGF- β e IL-10.

In conclusione, i risultati di questa ricerca hanno dimostrato che, in presenza di un danno al SNC, URB597 è in grado di dirigere la polarizzazione microgliale verso il fenotipo M2 anti-infiammatorio.

INTRODUZIONE

1. Neuroinfiammazione

La neuroinfiammazione è un processo infiammatorio “citochina-mediato”, provocato da un danno tissutale sistemico oppure associato a un danno diretto a carico del sistema nervoso centrale (SNC). Si differenzia dall’infiammazione in altri tessuti per la scarsa presenza di vasi linfatici all’interno del parenchima cerebrale, per la mancanza di cellule endogene capaci di presentare l’antigene e per la presenza della barriera ematoencefalica, che riduce lo scambio di cellule immunitarie e mediatori dell’infiammazione con il circolo sanguigno. Una volta si riteneva che il cervello fosse un “organo immunologicamente privilegiato” e che non venisse interessato da risposte immuni o da quelle infiammatorie. Questa visione è stata drasticamente ridimensionata nell’ultimo decennio in seguito a studi sulle interazioni tra cervello e sistema immunitario. Infatti, infezioni, traumi, ictus, tossine e altri stimoli sono in grado di produrre un’attivazione immediata e di breve durata del sistema immunitario innato. Già nel 1910, Fisher ipotizzò che la deposizione di una sostanza estranea nella corteccia umana fosse in grado di indurre una reazione infiammatoria locale seguita da cambiamenti rigenerativi dei neuroni circostanti (Fisher, 1910). Numerose evidenze hanno dimostrato un’associazione tra malattie neurodegenerative e processi di neuroinfiammazione cronica (Bok, 2005; Kuehn, 2005). Inoltre, vari studi hanno indicato che processi infiammatori possano avere inizio prima che si abbia una perdita significativa della popolazione neuronale (McGeer *et al.*, 1994).

2. Malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative (MND) costituiscono un insieme di condizioni patologiche accomunate da una lenta, progressiva e irreversibile perdita di neuroni e sinapsi in determinate aree del SNC (Skovronsky *et al.*, 2006). Sebbene le MND abbiano eziologie diverse, è possibile individuare alcuni elementi comuni, come ad esempio la morte neuronale, l'accumulo di proteine aberranti o caratterizzate da ripiegamenti anomali, la presenza di infiammazione e gliosi (Soto, Estrada, 2008). Le cause esatte alla base delle MND il più delle volte non sono note, tuttavia, sembrano abbracciare una vasta serie di fattori, sia genetici che ambientali, che agiscono provocando eventi che favoriscono lo sviluppo di neurotossicità. Studi recenti suggeriscono che le cellule non neuronali, termine con cui si indicano tutte le cellule presenti nel SNC diverse dai neuroni, siano coinvolte nei meccanismi neurodegenerativi (Hui *et al.*, 2016) che portano all'instaurarsi di malattie quali il Parkinson, l'Alzheimer e, di conseguenza, il loro controllo farmacologico rappresenterebbe una strategia interessante nel trattamento di queste patologie.

3. Cellule della Microglia

Il cervello è composto da diverse popolazioni cellulari in stretta comunicazione tra di loro e con funzioni specifiche. Tra esse, la microglia rappresenta la “centrale elettrica” del sistema immunitario innato.

Le cellule della microglia sono un tipo di cellule della glia che si occupano della principale difesa immunitaria attiva nel SNC. Costituiscono più del 10% della popolazione totale di cellule gliali all'interno del cervello (Soulet, Rivest, 2008). Sono diffuse omogeneamente nel parenchima cerebrale e possono ritrovarsi adese ai neuroni, ma anche in corrispondenza di vasi sanguigni, e libere nella materia grigia. Queste cellule sono interne alla barriera ematoencefalica e, pertanto, sono pronte a recepire e rispondere a eventuali danni della barriera stessa. Furono identificate inizialmente da Rio Hortega nel 1919, che ne sostenne l'origine mesodermica. Recenti studi hanno dimostrato che originano da un pool di macrofagi primitivi residenti nel sacco vitellino, che migrano in fase embrionale e si inseriscono nel neuroepitelio in via di sviluppo (Ginhoux, Prinz, 2015). Nel momento in cui i progenitori microgliali hanno infiltrato il cervello, adottano una morfologia ramificata: questo fenotipo indica lo stato di riposo di questa popolazione cellulare, caratterizzato dalla presenza di processi affusolati e un piccolo corpo cellulare (Kettenmann *et al.*, 2011). Studi più recenti hanno invece dimostrato come la microglia non sia mai a riposo, ma si trovi in uno stato di motilità, che le permette di sorvegliare continuamente il cervello in cerca di alterazioni dell'omeostasi cerebrale (Kettenmann *et al.*, 2013). In particolare, in condizioni fisiologiche, la microglia utilizza le ramificazioni dinamiche come sentinelle del microambiente circostante, modulandone la lunghezza e

la direzione, senza cambiamenti significativi del soma cellulare. In condizioni neuropatologiche o in presenza di agenti infettivi, la microglia va incontro ad una rapida attivazione, adottando un fenotipo ameboide caratterizzato da un ampio corpo cellulare. Davalos *et al.* (2005) hanno dimostrato che l'induzione di un danno a livello cerebrale induce le cellule della microglia a estendere le proprie ramificazioni verso il sito di insulto, e a mobilizzarsi verso quest'ultimo. In relazione alla natura del segnale, la microglia orchestra una risposta specifica, mediante recettori e vie di segnalazione differenti, che include la fagocitosi, l'aumento della migrazione, la proliferazione e il rilascio di molecole bioattive (Soulet, Rivest, 2008). È possibile distinguere quindi, due differenti fenotipi basati su valutazioni *in vitro*: il fenotipo classico M1 pro-infiammatorio, e il fenotipo alternativo M2 anti-infiammatorio (Saijo, Glass, 2011) (*Fig. 1*).

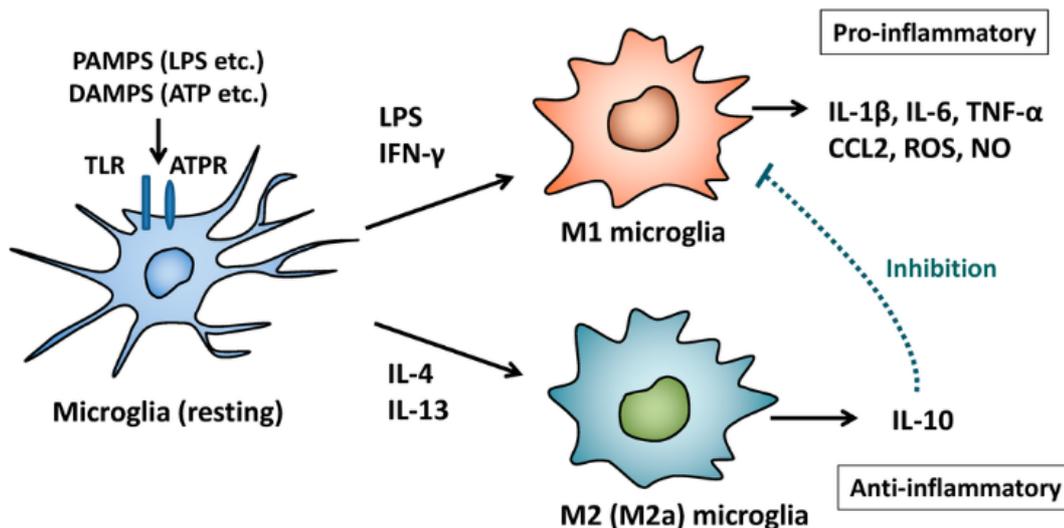


Figura 1. Attivazione delle cellule microgliali
(modificata da Nakagawa e Chiba, 2014)

Il fenotipo classico M1 può essere indotto dalla stimolazione da parte del lipopolisaccaride (LPS), molecola presente sulla membrana dei batteri GRAM-negativi, ed è caratterizzato da un eccessivo rilascio di citochine pro-infiammatorie, come il tumor necrosis factor alfa (TNF- α) e l'interleukin-1 beta (IL-1 β), intermedi reattivi dell'ossigeno, fattori del complemento e chemochine (Boche *et al.*, 2013). Tali mediatori infiammatori promuovono l'infiltrazione di cellule del sistema immunitario dal circolo ematico, il richiamo di altre cellule microgliali dalle aree circostanti e l'attivazione degli astrociti. Le cellule della microglia presenti nelle aree perivascolari esercitano, inoltre, la funzione di cellule presentanti l'antigene (APC) sulle cellule T mielina-specifiche, che si sono infiltrate nel SNC e che possono dare inizio così ai processi infiammatori. Il fenotipo alternativo M2 può essere indotto dalla stimolazione da parte della citochina anti-infiammatoria IL-4 ed è

caratterizzato dal rilascio di citochine immunomodulatorie, come IL-15, anti-infiammatorie, come IL-10, e di fattori di crescita e neurotrofici come il Trasforming Growth Factor beta (TGF- β), il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), l'Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1), il Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), il Nerve Growth Factor (NGF) e presenta, inoltre, una prominente capacità fagocitica (Saijo, Glass, 2011; Boche *et al.*, 2013). Lo shift verso il fenotipo M1, quindi, porterebbe ad accentuare la risposta infiammatoria, mentre, lo shift verso il fenotipo M2 alla soppressione dello stato infiammatorio (Heneka *et al.*, 2013). Ulteriori studi ritengono che il potenziale di adottare un fenotipo piuttosto che l'altro dipenda dalla natura dello stimolo scatenante e dal contesto spazio-temporale in cui le cellule sono analizzate (Mosser, Edwards, 2008).

4. Microglia e malattia di Alzheimer

Le cellule microgliali, agendo da “sentinelle”, esercitano una funzione di immunosorveglianza, essenziale nel SNC, poiché permettono all’organismo di rilevare i primi segni di un’eventuale danno tissutale o della presenza di un patogeno, attivando di conseguenza una risposta infiammatoria. Tuttavia, l’attivazione di queste cellule potrebbe determinare lo sviluppo sia di effetti benefici sia di effetti dannosi, innescando dei processi neuroinfiammatori cronici, che si osservano in molte malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Alzheimer. Molteplici riscontri supportano l’ipotesi che nella malattia di Alzheimer possa essere presente una componente neuroinfiammatoria. McGeer e Eikelenboom furono i primi ricercatori a identificare chiaramente una componente infiammatoria nella malattia di Alzheimer (Eikelenboom *et al.*, 1991; Eikelenboom *et al.*, 1994; McGeer *et al.*, 1994). Esami autoptici effettuati su pazienti affetti dal morbo di Alzheimer rivelano elevati livelli di citochine pro-infiammatorie, chemochine, radicali liberi dell’ossigeno, mediatori dell’infiammazione (Perry *et al.*, 2002). Nonostante l’attivazione della microglia sia spesso neuroprotettiva, l’iper-attivazione di queste cellule può causare neurotossicità attraverso il rilascio di citochine infiammatorie e chemochine (Block *et al.*, 2005). E’ stato inoltre osservato che queste cellule, una volta attivate, hanno una maggiore tendenza ad indurre meccanismi infiammatori cronici, piuttosto che processi riparativi (Zhiyou Cai *et al.*, 2014), promuovendo in questo modo lo sviluppo di danni neuronali e la cronicizzazione del processo (*Fig. 2*).

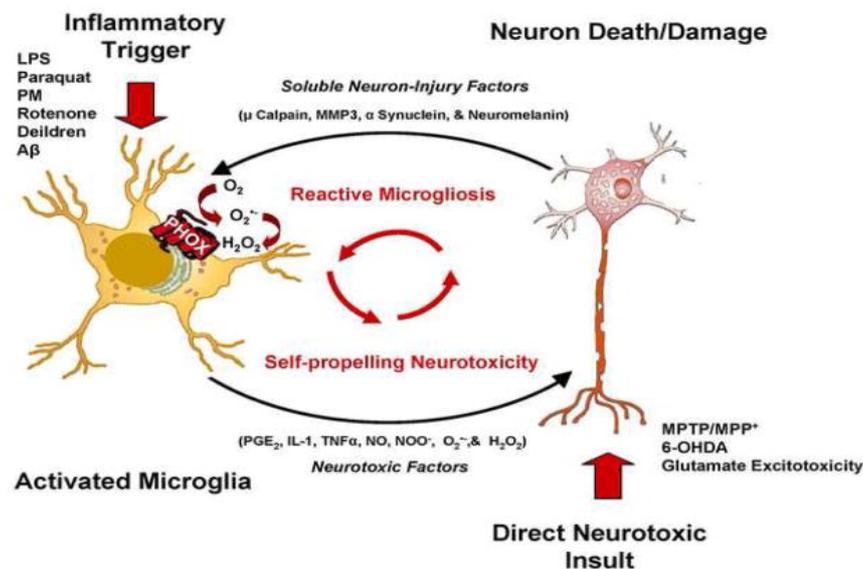


Figura 2. Attivazione della microglia, indotta da diversi stimoli e cronicizzazione della risposta infiammatoria (tratta da Melinda et al., 2010).

La microglia mostra, quindi, un ruolo rilevante nella patologia di Alzheimer. La patologia di Alzheimer è una forma di demenza invalidante ad esordio prevalentemente senile, che distrugge progressivamente le cellule cerebrali, portando ad un progressivo declino della memoria ed altre funzioni cognitive, come il linguaggio e la percezione, rendendo a poco a poco l'individuo che ne è affetto incapace di una vita normale. Coinvolge principalmente aree cerebrali deputate alla regolazione di queste funzioni, quali: il sistema limbico, l'ippocampo, e le cortecce frontale, temporale e parietale (Fig. 3).

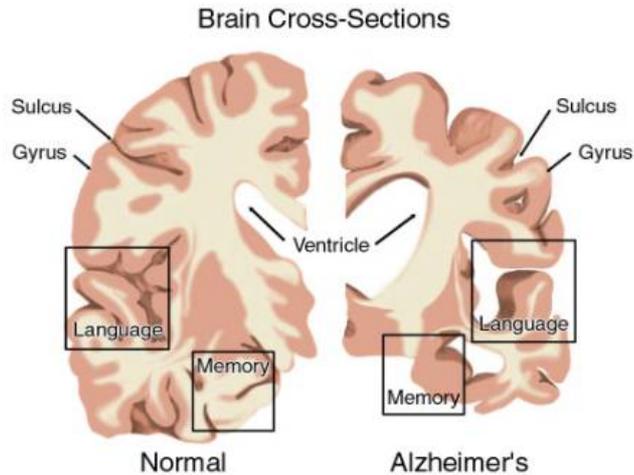


Figura 3. Rappresentazione delle aree cerebrali colpite della malattia di Alzheimer.

Sotto il profilo istologico, la patologia di Alzheimer si caratterizza per la formazione, a livello corticale, di matasse neurofibrillari intracellulari e di placche senili extracellulari, che provocano disfunzione sinaptica fino alla morte neuronale. Le prime sono composte dalla proteina tau iperfosforilata, appartenente alla famiglia delle Microtubule-Associated Proteins, (MAP), mentre le placche senili sono accumuli della proteina beta-Amiloide ($A\beta$) (Yankner, 1996; Mayeux, Sano, 1999) (*Fig. 4*).

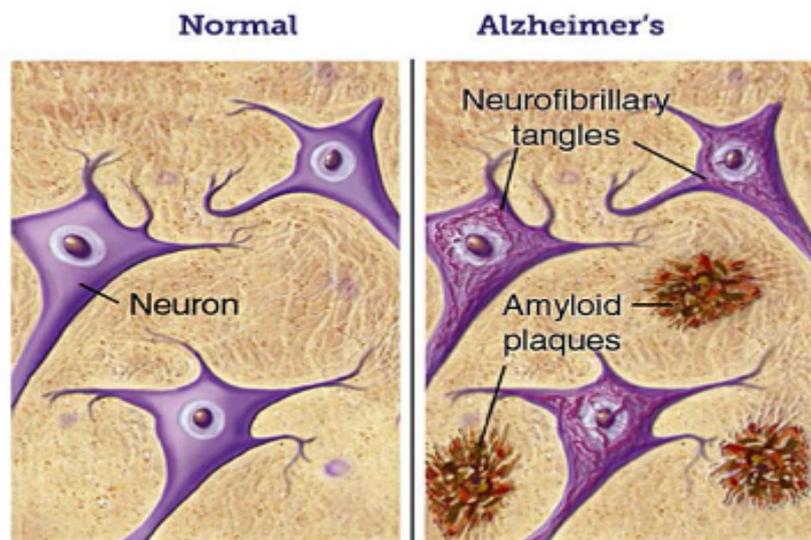


Figura 4. Formazione di grovigli neurofibrillari e placche senili nella malattia di Alzheimer

Tali placche senili sono degli aggregati extracellulari costituiti da una parte esterna in cui si accumulano detriti neuronali, e da una parte centrale formata da aggregati di $A\beta$, peptide derivante dall'errato processamento della *Amyloid Precursor protein* (APP), glicoproteina transmembrana normalmente espressa dai neuroni (Walsh e Selkoe, 2007). APP sembra avere funzioni neuroprotettive, neurotrofiche, di regolazione della concentrazione di calcio intracellulare mediante un meccanismo chinasi-dipendente (Mattson *et al.*, 1993), può inoltre fungere da canale trasportatore di cationi e da molecola di adesione (Shubert *et al.*, 1989; Thinakaran e Koo, 2008). Il gene codificante per APP è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 (Goate *et al.*, 1991), esso genera una trascritto che può subire differenti processi di splicing alternativo portando alla formazione di isoforme differenti della proteina. Nel citoplasma APP è substrato principale di tre enzimi, denominati rispettivamente α , β e γ secretasi (Haas, 2004), e segue due

pathway, uno non-amiloidogenico ed uno amiloidogenico (*Fig. 5*). Nel primo caso si ha un'idrolisi da parte dell' α secretasi a livello del segmento transmembrana, nel mezzo della sequenza di $A\beta$ (Esch *et al.* 1990; Sisodia *et al.*, 1990), generando un frammento solubile detto sAPP- α , ed un frammento transmembrana denominato C83, la cui successiva idrolisi da parte della γ secretasi produce il peptide P3, frammento non tossico di $A\beta$ (Haas *et al.*, 1993). Il processo amiloidogenico, invece, inizia con un'idrolisi da parte della β secretasi, liberando sAPP- β , il frammento transmembranario residuo C99 è dunque bersaglio della γ secretasi, che può tagliarlo in vari punti, generando peptidi di lunghezza variabile. Tra questi, il peptide $A\beta$ di 42 amminoacidi risulta essere il più tossico. L'eccessiva deposizione di $A\beta$ nello spazio perineurale, che sembra essere legata ad una diminuzione della sua clearance, oppure ad un processamento di APP sbilanciato verso il pathway amiloidogenico, tende a formare degli aggregati fibrillari dal diametro di 50-200 μm , circondati da dendriti, assoni distrofici, cellule microgliali ed astrociti reattivi (Dickson, 1997).

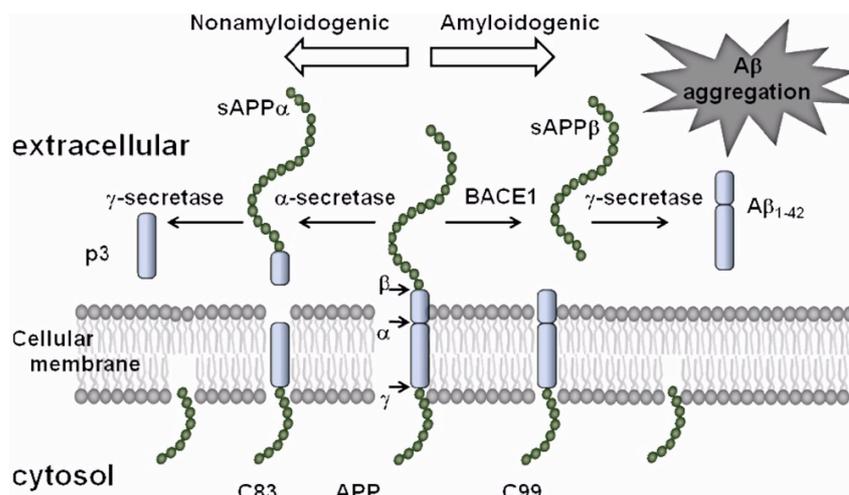


Figura 5. Rappresentazione schematica della processazione di APP (tratta da Young-Jung Lee et al., 2010)

Questi aggregati fibrillari sono responsabili dell'effetto neurotossico: ancora oggi non sono chiari nel dettaglio i meccanismi molecolari con cui questi complessi esercitano tale effetto. È stata tuttavia dimostrata la capacità degli aggregati amiloidi di attivare la risposta microgliale, inducendo nelle cellule il rilascio di mediatori flogistici quali ROS, ossido nitrico ed interleuchine, responsabili della morte neuronale (Akiyama et al., 2000; Kitazawa et al., 2004).

In risposta alla A β le cellule della microglia si concentrano attorno alle placche (Itagaki et al. 1989), e innescano una risposta infiammatoria dovuta alla locale attivazione delle stesse con il conseguente rilascio di neurotossine e fattori, tra cui le chemochine, che attraggono chemiotatticamente ulteriori cellule microgliali dalla periferia (Rogers et al., 2002; Davalos et al., 2005). In questo contesto le cellule della microglia svolgono un ruolo importante con un doppio meccanismo. Infatti, esse mediano il processo di guarigione attraverso la distruzione di antigeni e la fagocitosi dei tessuti danneggiati; d'altra parte, la loro

iperattivazione determina un eccessivo rilascio di fattori citotossici, con conseguenti effetti disastrosi non solo per i tessuti danneggiati, ma anche per quelli sani e principalmente sulla popolazione neuronale. Data questa duplice e opposta attività, non è ancora chiaro se la microglia abbia un ruolo dannoso o protettivo nel processo patologico. Chiarire quindi tali meccanismi potrebbe consentire la scoperta di target farmacologici per la terapia della patologia di Alzheimer e di molte altre malattie neurodegenerative.

5. Terapia farmacologica della malattia di Alzheimer

A tutt'oggi le basi molecolari della patogenesi della malattia di Alzheimer non sono ancora pienamente comprese e non si dispone di una terapia farmacologica efficace per contrastare il decorso clinico della malattia. L'approccio farmacologico attualmente adottato si propone di correggere gli squilibri dei neurotrasmettitori che si instaurano come conseguenza della morte neuronale. Si è rivelato efficace l'utilizzo degli inibitori delle acetilcolinesterasi, enzimi preposti all'idrolisi dell'acetilcolina con produzione di colina ed acetato. Inibendo questi enzimi si aumenta la concentrazione di acetilcolina negli spazi inter-sinaptici, potenziando l'azione del neurotrasmettitore e dunque l'attivazione post-sinaptica (Munoz-Torrero. 2008). Questa classe di farmaci ha prodotto un discreto miglioramento delle funzioni cognitive in pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer di entità moderata, mentre resta in dubbio l'efficacia terapeutica sulle forme più severe.

Alcuni antiinfiammatori sono in grado di ritardare la neurodegenerazione; difatti, numerosi mediatori dell'infiammazione, sono frequentemente associati alla presenza di depositi di A β , favorendo l'aggregazione ed incrementandone la tossicità (Ali *et al.*, 2019). Un altro farmaco approvato nel trattamento della malattia di Alzheimer è la memantina, antagonista non competitivo del recettore dell'N-metildiaspartato (NMDA), il cui utilizzo è motivato dal fatto che nel SNC di pazienti affetti da Alzheimer è riscontrabile una deregolazione dell'omeostasi del calcio intracellulare, assieme ad una eccessiva attivazione del recettore NMDA (Sonkusare *et al.*, 2005; Folch *et al.*, 2018). Ad oggi nessun farmaco utilizzato in terapia sembra migliorare la prognosi della patologia, infatti, le strategie terapeutiche

attuali sono finalizzate esclusivamente ad alleviarne i sintomi ed a rallentarne il decorso. Per tale motivo vi è dunque la necessità di introdurre in terapia nuove molecole in grado di intervenire sui meccanismi fisiopatologici alla base della malattia di Alzheimer. In questo scenario, un crescente interesse è stato focalizzato sul sistema endocannabinoide, come risposta adattativa allo stress, altamente espresso nel sistema nervoso centrale, motivato dai numerosi effetti neuroprotettivi descritti in letteratura.

6. Sistema Endocannabinoide

Negli ultimi decenni del secolo scorso si è assistito ad un ritorno d'interesse del mondo scientifico nei confronti della Canapa, una pianta erbacea a ciclo annuale il cui nome scientifico è *Cannabis sativa*. Nel 1988, alcuni ricercatori scoprirono la presenza nel corpo umano di un recettore di membrana capace di essere attivato dal delta-9-tetraidroacannabinolo (Δ^9 -THC), il più potente tra i numerosi principi attivi presenti nella *Cannabis* (Devane *et al.*, 1988). Il sospetto che si trattasse del recettore per i cannabinoidi fu confermato definitivamente nel 1988, quando, successive indagini decretarono che quel recettore isolato nel cervello di ratto, era effettivamente lo specifico recettore attraverso cui i cannabinoidi mediavano gli effetti farmacologici e comportamentali (Devane *et al.*, 1988). Questo recettore fu chiamato CB1, e, poco dopo, fu individuato un secondo recettore, CB2, che spiegava gli effetti immunosoppressivi che i derivati della cannabis presentavano nel sistema immunitario. La scoperta dell'esistenza di specifici recettori per il THC fu prontamente seguita dalla ricerca dei ligandi endogeni per tali proteine: gli endocannabinoidi. Oggi è ampiamente accettato che il sistema endocannabinoide comprenda i recettori cannabinoidi, gli endocannabinoidi e gli enzimi coinvolti nella sintesi e nella degradazione degli endocannabinoidi.

7. Endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi sono una nuova classe di mediatori lipidici derivanti dall'acido arachidonico. L'anandamide (AEA) ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) sono stati i primi identificati e sono pertanto i ligandi endogeni per i CB meglio conosciuti. L'AEA è in grado di legare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi come un agonista parziale (Burkey *et al.*, 1997; Glass and Northup, 1999); anche il 2-AG è in grado di attivare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi, però, come un agonista pieno (Mechoulam *et al.*, 1995). Entrambi AEA e 2-AG sono considerati neuromodulatori locali, differenziandosi da altri neuromodulatori poiché non vengono immagazzinati in vescicole, ma prodotti *on demand*, in seguito a stimoli potenzialmente citotossici e rilasciati all'esterno della cellula dove esplicano effetti ipotensivi, antiossidanti, anti-infiammatori, immunosoppressori ed antidolorifici (Calignano *et al.*, 1998).

Il meccanismo di trasmissione degli endocannabinoidi nel sistema nervoso differisce da quelli dei sistemi di trasmissione classica (e.s. colinergico, aminoacidergico e monoaminergico). La neurotrasmissione degli endocannabinoidi si verifica mediante un meccanismo retrogrado (*Fig. 6*): una volta sintetizzati, vengono rilasciati dal neurone postsinaptico all'esterno della cellula, dove vanno a legarsi ai recettori presenti sulle membrane presinaptiche. Lo spegnimento del segnale prevede, quindi, la loro ricaptazione da parte della cellula, l'idrolisi enzimatica e la riesterificazione dei prodotti ottenuti nei fosfolipidi di membrana. Dopo essere stati sequestrati dal versante extracellulare, gli EC, all'interno della cellula, sono soggetti ad un'idrolisi enzimatica. L'enzima maggiormente coinvolto nella degradazione degli endocannabinoidi (sia AEA e 2-AG) è una idrolasi

specifica conosciuta come Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), proteina integrale di membrana. Il 2-AG può essere idrolizzato anche da un'altra classe di enzimi, quali le monoacilglicerololipasi (MAGLs), che sono presenti sia a livello di membrana che a livello citosolico e che riconoscono come substrato anche altri monoacilgliceroli diversi dal 2-AG (Goparaju *et al.*, 1999; Di Marzo *et al.*, 1999).

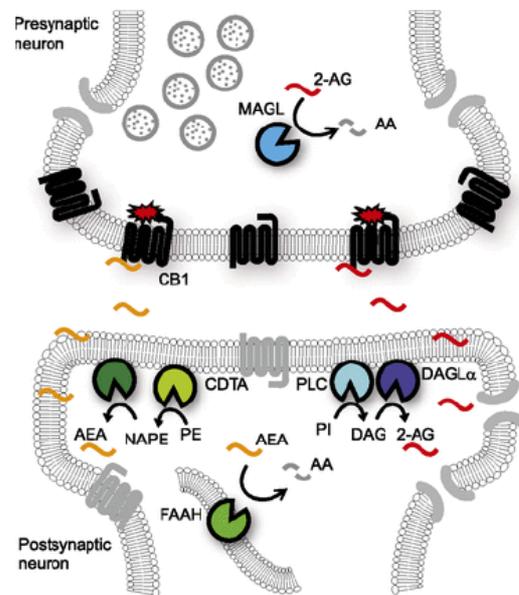


Figura 6. Rappresentazione del meccanismo retrogrado degli endocannabinoidi

Negli ultimi anni è emerso che l'insorgenza di alcune patologie, la manifestazione di alcuni sintomi e il decorso di alcune malattie, sono in qualche modo legate ad alterazioni del tono endocannabinoide. La scoperta del sistema endocannabinoide e la delucidazione del suo funzionamento sono state, quindi, una pietra miliare nella ricerca in questo campo e rappresentano oggi un valido strumento per lo sviluppo di farmaci alternativi per alcuni stati patologici come la malattia di Alzheimer.

8. Recettori degli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi esercitano i loro effetti farmacologici attraverso l'attivazione di almeno due distinti recettori cannabinoidi, CB1 e CB2. Recenti lavori hanno dimostrato che questi composti sono in grado di interagire anche con recettori diversi da quelli sopracitati, tra cui i recettori PPAR, GPR55 e TRPV1 (Sharir *et al.*, 2012; Iannotti *et al.*, 2016) (Fig. 7).

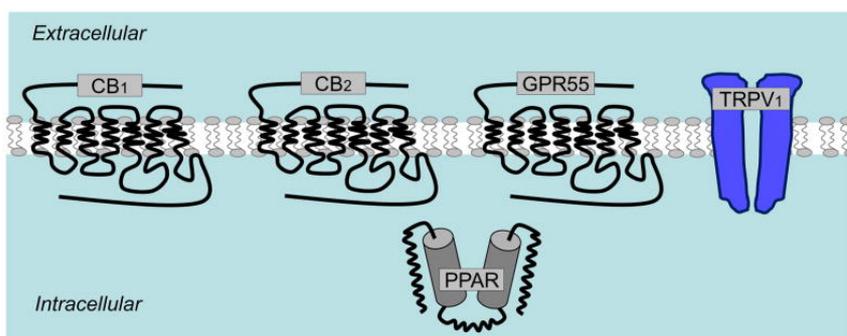


Figura 7. Recettori attivati dagli endocannabinoidi (tratta da Stella, 2010)

I recettori CB1 e CB2 sono molecole accoppiate a proteine G con sette domini trans-membrana che presentano un'omologia di struttura del 68%. La loro distribuzione è molto diversa nel sistema nervoso centrale e in quello periferico. L'espressione del recettore CB1 è largamente ristretta ai neuroni, soprattutto in loci particolarmente importanti per il processamento nocicettivo a livello cerebrale, spinale e del sistema nervoso periferico (Devane *et al.*, 1988; Tsou *et al.*, 1998; Egertova, Elphick 2000). L'attivazione di questo recettore porta alla chiusura di canali permeabili al calcio e all'apertura di canali ionici per il potassio (Bahr *et al.*, 2006), con conseguente iperpolarizzazione neuronale ed inibizione del rilascio di neurotrasmettitori quali l'acido γ -amminobutirrico (GABA), glutammato e serotonina dalla membrana

presinaptica. CB2 è espresso principalmente da cellule immunitarie, compresa la microglia nel cervello; per tale motivo si ipotizza un ruolo nella mediazione degli effetti immunosoppressivi del THC (Cabral *et al.*, 2008), sebbene ci siano evidenze che supportano un ruolo di CB2 in processi neurologici, quali ansia e dipendenza (Onaivi, 2006). Alcune evidenze sperimentali hanno dimostrato una stretta correlazione tra la sua overespressione a livello delle cellule gliali e la presenza di neuroinfiammazione (Mukhopadhyay *et al.*, 2006), suggerendo che la sua espressione possa costituire una risposta endogena di tipo protettivo a condizioni potenzialmente dannose.

9. Endocannabinoidi e malattia di Alzheimer

Si ritiene che il sistema endocannabinoide sia attivato da più sollecitazioni e possa suscitare risposte multiple, come ad esempio la difesa anti-eccitotossica e antiossidante, nonché azioni neuromodulatorie e immunomodulatorie, che aiutino a ripristinare l'omeostasi cerebrale in condizioni patologiche diverse (Fezza *et al.*, 2014). Alterazioni di vario tipo nel sistema endocannabinoide sono state riscontrate in concomitanza con la presenza della malattia di Alzheimer. Studi effettuati su cervelli *post-mortem* di individui affetti da Alzheimer hanno mostrato l'espressione aumentata dei recettori CB1 e CB2 nella microglia situata a ridosso delle placche amiloidi (Ramirez *et al.*, 2005). Inoltre, l'espressione della FAAH, enzima responsabile della degradazione della AEA, risulta aumentata a livello delle placche senili (Benito *et al.*, 2003).

Diversi studi sperimentali attribuiscono al sistema endocannabinoide un possibile ruolo neuroprotettivo nei confronti di diverse situazioni patologiche coinvolte nella patogenesi della malattia di Alzheimer, quali stress ossidativo, infiammazione ed eccitotossicità (Jackson *et al.*, 2005). L'interesse riguardo il ruolo del sistema endocannabinoide nella terapia dell'Alzheimer è incrementato dal fatto che i suoi effetti farmacologici comprendono una serie di meccanismi propri di farmaci quali la memantina ed alcuni farmaci antinfiammatori non steroidei, che ne hanno motivato l'utilizzo nella terapia di tale patologia. La gliosi e la degenerazione dei neuroni a livello dell'ippocampo causati da A β sono stati associati ad un aumento della produzione di 2-AG, il che potrebbe significare che il sistema endocannabinoide si possa attivare in risposta ad un danno neuronale, rappresentando un tentativo di neuroprotezione da parte dell'organismo (Pazos *et al.*, 2004).

Recenti prove mostrano aumentati livelli di AEA e 2-AG nei topi affetti da Alzheimer dopo l'inibizione cronica di FAAH e MAGL. L'inattivazione farmacologica e genetica di questi due enzimi migliora notevolmente i sintomi della malattia in termini di accumulo di A β , neuroinfiammazione e declino cognitivo (Ramirez *et al.*, 2005). Potenziando, quindi, l'attività degli endocannabinoidi, mediante somministrazione di un inibitore del loro uptake, si potrebbe ottenere una riduzione della tossicità indotta da A β in cellule microgliali.

10. Inibitori del sistema endocannabinoide: URB597

Le tecniche genetiche e farmacologiche utilizzate per lo studio del sistema endocannabinoide hanno identificato la FAAH come un promettente bersaglio terapeutico per il trattamento di un'ampia gamma di disturbi infiammatori (Joel *et al.*, 2009), tra cui malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer (Bisogno *et al.*, 2008). L'enzima FAAH appartiene alla classe delle idrolasi ed è suscettibile a diverse classi di inibitori, quali: fluorofosfonati, trifluorometil chetoni, carbammati. Quest'ultima classe di inibitori è particolarmente efficace in vivo, probabilmente grazie al suo meccanismo d'azione irreversibile: i carbammati sono in grado di inattivare l'enzima attraverso un meccanismo di carbamilazione della serina S241, modificando covalentemente il sito attivo della FAAH (Alexander *et al.*, 2005).

Tra i carbammati, la molecola URB597 (noto anche come KDS-4103) è un inibitore potente e selettivo della FAAH, in grado di non provocare i classici effetti cannabimimetici (ad esempio, catalessi, ipotermia, iperfagia). È stato mostrato come la somministrazione orale ripetuta della molecola URB597 (1–50 mg/kg, una volta al giorno per quattro giorni) abbia prodotto antipiralgia ed effetto antidolore in un modello di dolore neuropatico nel topo (Russo *et al.*, 2007), e una potente attività antidepressiva in modelli animali (Gobbi *et al.*, 2005).

Gli effetti dell'inibizione della FAAH sono accompagnati da un aumento dei livelli cerebrali di AEA. Studi hanno mostrato come l'AEA partecipi alla modulazione degli stati emotivi e l'inibizione dell'enzima FAAH potrebbe rappresentare un approccio alla terapia di modulazione dell'ansia (Kathuria *et al.*, 2003).

Recenti prove hanno mostrato, in topi affetti dalla malattia di Alzheimer, aumentati livelli di AEA e 2-AG dopo l'inibizione cronica

di FAAH e MAGL. L'inattivazione farmacologica e genetica di questi due enzimi migliora notevolmente i sintomi della malattia in termini di aggregazione di A β , neuroinfiammazione e declino cognitivo (Chen *et al.*, 2012; Vazquez *et al.*, 2015). La caratterizzazione fenotipica dei cambiamenti correlati alla malattia di Alzheimer in pazienti umani, ha rilevato che FAAH, ma non MAGL, è specificatamente up-regolato nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) (D'Addario *et al.*, 2012), nell'ippocampo e nella corteccia entorinale (Benito *et al.*, 2003), suggerendo un ruolo preminente di FAAH. Di conseguenza, è stato scoperto che i livelli di AEA, a differenza di quelli della 2-AG, sono ridotti nella corteccia temporale dei pazienti affetti da Alzheimer, dove sono inversamente correlati al contenuto di A β (Jung *et al.*, 2012). Questi dati suggeriscono che la modulazione del sistema endocannabinoide, rappresenta uno strumento per la comprensione dei meccanismi alla base dell'insorgenza di patologie come la malattia di Alzheimer.

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando la linea microgliale murina BV2, costituita da cellule immortalizzate derivate da cellule primarie di microglia murina, infettate con un vettore retrovirale esprimente gli oncogeni v-raf e v-myc (Blasi *et al.*, 1990), caratterizzate dalla capacità di mantenere molte delle funzioni e delle proprietà morfologiche e fenotipiche espresse in vivo dalle cellule microgliali (Henn *et al.*, 2009).

Queste cellule possono essere mantenute in coltura fornendo loro sostanze quali zuccheri, amminoacidi, vitamine e lipidi necessarie alla sopravvivenza in vitro. Per la crescita di queste cellule è stato utilizzato terreno di coltura DMEM-F12, al quale sono stati aggiunti FBS (siero fetale bovino) al 5%, antibiotici quali Penicillina/Streptomicina all'1%, e il 2% (concentrazione finale di 4 mM) dell'amminoacido non essenziale L-Glutamina.

Le cellule sono state seminate in flasks da 75 cm², fatte crescere in incubatore, mantenute per un massimo di 2 settimane, nell'intervallo di 8-11 passaggi, ad una temperatura costante di 37°C in un ambiente umidificato al 95% e contenente CO₂ al 5%.

2. Trattamenti

Il frammento 25-35 del peptide A β (A β ₂₅₋₃₅) è stato ottenuto per sintesi su fase solida convenzionale (Atherton, Sheppard, 1989). È stato

disciolto in tampone fosfato salino (PBS) (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄) ad una concentrazione di 1mM, sonicato per 30 minuti in un sonicatore a bagnetto, aliquotato in frazioni da 800 μ l e successivamente diluito con il terreno di coltura, fino alla concentrazione richiesta di 30 μ M; le restanti aliquote sono state conservate a -20°C.

L'inibitore URB597 (Selleck Chemicals) è stato disciolto in DMSO (dimetilsolfossido) e successivamente diluito con il terreno di coltura fino alla concentrazione di 5 μ M.

Le cellule BV-2 sono state pretrattate con URB597 a una concentrazione di 5 μ M per 4h e successivamente è stata aggiunta A β ₂₅₋₃₅ ad una concentrazione finale di 30 μ M per tempi variabili. Sono stati allestiti esperimenti di controllo con cellule non trattate, trattate esclusivamente con URB597 o con A β ₂₅₋₃₅ o mediante trattamento combinato di URB597 e A β . Il DMSO è stato utilizzato come controllo.

3. Saggio per l'attività enzimatica di FAAH

È stato valutato l'effetto della stimolazione con A β sull'attività enzimatica di FAAH in cellule BV-2 a 4 e 24 ore, come precedentemente riportato (Cascio *et al.*, 2004). In breve, le cellule sono state omogeneizzate a 4°C in tampone Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. Gli omogeneizzati sono stati prima centrifugati a 800 g per eliminare i detriti, e il surnatante è stato centrifugato a 12.000 g. I pellet di quest'ultima centrifugazione sono stati utilizzati per il dosaggio. Le membrane sono state incubate con [¹⁴C] AEA (5 μ M, 5,0 mCi / mmol, Larodan AB, Solna, Svezia) in Tris-HCl 50 mM, pH 9, per 30 minuti a

37 °C. [14C] L'etanolamina prodotta dall'idrolisi AEA [¹⁴C] è stata misurata, come precedentemente riportato (Cascio *et al.*, 2004), mediante scintillatore (Beckman).

4. Saggio MTT

Per valutare la citotossicità di URB597, è stato effettuato un saggio con MTT (bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio) (MTT Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen): un test colorimetrico quantitativo. Il saggio si basa sulla capacità dell'enzima succinato deidrogenasi mitocondriale, presente nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, di color giallo e solubile in soluzioni acquose, in formazano, dalla colorazione viola e insolubili in soluzioni acquose, mediante rottura dell'anello tetrazolico. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e, quindi, all'attività metabolica e alla vitalità cellulare. Questo test fornisce un'indicazione relativa della popolazione vitale e permette di valutare la tossicità di una sostanza attraverso il confronto tra gli indici di vitalità cellulare, ottenuti dalle cellule trattate, rispetto ai controlli. La densità ottica (OD) è misurata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda pari a 570 nm.

Le cellule BV-2 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 3000 cellule/pozzetto. Al fine di determinare la concentrazione ottimale dell'inibitore da utilizzare negli esperimenti successivi, le cellule sono state trattate con tre concentrazioni di URB597: 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M per 24, 48 e 72 ore. Successivamente, un altro saggio è

stato condotto per valutare la vitalità delle cellule trattate con A β alla concentrazione di 30 μ M in presenza o in assenza di URB597, per 24 e 48 ore. Le piastre sono state successivamente incubate al buio per 2 ore con 20 μ l per pozzetto di una soluzione in PBS di MTT 5 mg/ml. Dopo aver rimosso il contenuto del pozzetto, il formazano, essendo insolubile, è stato estratto con 100 μ l di DMSO per pozzetto. Infine, l'assorbanza è stata misurata con uno spettrofotometro per piastre (Microplate Reader Versamax, Molecular Devices) alla lunghezza d'onda di 570 nm.

5. Immunofluorescenza

Per gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati utilizzati vetrini di 12 mm di diametro, posti in piastre da 24 pozzetti, passati precedentemente in etanolo assoluto e poi sulla fiamma per sterilizzarli. Cellule BV-2, alla concentrazione di 15×10^3 cellule/pozzetto, sono state seminate sui vetrini e incubate a 37°C per 24 ore. Le cellule sono state pretrattate con URB597 alla concentrazione di 5 μ M per 4 ore e successivamente stimulate o non con A β (30 μ M) in presenza dell'inibitore per 1, 3, 6, 24 ore, quindi fissate con paraformaldeide al 4% in PBS per 30 minuti a 25°C, trattate poi con glicina 0.1 M in PBS per 20 minuti a 25°C per tamponare le aldeidi, e permeabilizzate con 0.1% di Triton X-100 in PBS per 5 minuti. Per osservare l'organizzazione dell'actina citoscheletrica, le cellule sono state incubate con falloidina coniugata a rodamina (falloidina-TRITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), alla concentrazione di 1:50 in PBS per 45 minuti.

Al fine di determinare la localizzazione del marcatore microgliale Iba1, le cellule, dopo trattamento di 24 ore con A β (30 μ M) sono state incubate con un anticorpo primario anti-Iba1 (Immunological Sciences, IT) alla concentrazione di 1:100 in PBS per 1 ora e, quindi, incubate con un anticorpo secondario goat-anti-rabbit Alexa-Fluor 488 (Biotium, Inc, Landing Parkway, Fremont, CA, USA) per 30 minuti, alla concentrazione di 1:100 in PBS.

Per visualizzare i marker di polarizzazione M1/M2, cellule BV-2, dopo trattamento di 24 ore con A β (30 μ M), sono state incubate rispettivamente con gli anticorpi primari anti-iNOS (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) alla concentrazione di 1:100 in PBS, e Arginasi-1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) alla concentrazione di 1:50 in PBS, per 1 ora. Successivamente, sono state incubate con un anticorpo secondario goat-anti-rabbit Alexa-Fluor 488 (Biotium, Inc, Landing Parkway, Fremont, CA, USA) per 30 minuti, alla concentrazione di 1:100 in PBS. Dopo 3 lavaggi in PBS e l'incubazione con il colorante DAPI per 5 minuti, per marcare il nucleo, i vetrini sono stati lavati per 3 volte in PBS e quindi montati capovolti su vetrini porta-oggetto con 5 μ l di Mowiol.

Il segnale della fluorescenza è stato analizzato utilizzando il microscopio AxioObserver della Zeiss (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germania), collegato ad un sistema Apotome e dotato del software Axio Vision. L'analisi quantitativa dell'area cellulare e dell'intensità di fluorescenza è stata effettuata mediante l'utilizzo del software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

6. Analisi di western blot

I campioni, trattati come precedentemente descritto, sono stati processati per l'estrazione delle proteine con un tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 0,5% NaDOC, 0,1% SDS, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1X CIP, 1% NP-40). I campioni, incubati in questa soluzione per 30 minuti in ghiaccio, sono stati sonicati e centrifugati a 14000 RPM per 15 minuti a 4°C. Le proteine contenute nel surnatante sono state quantificate con il metodo Bradford, utilizzando come standard l'albumina di siero bovino (BSA). Per ciascun campione, 20 µg di proteine sono stati addizionati al Laemmli buffer (240 mM Tris-HCl, pH 6.8, 40% glicerolo, 5% β-mercaptoetanolone, 8% SDS, 0,04% di Blu di Bromofenolo) e portati alla temperatura di 80°C per circa 3 minuti. I campioni sono stati caricati su gel di poliacrilammide SDS-PAGE a gradiente 4-20% (Criterion TGX Precast Protein Gels – Bio-Rad) e fatti correre in una cella elettroforetica. Al termine della corsa, le proteine separate per peso molecolare, sono state trasferite su una membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF) (Bio-Rad) mediante elettrotrasferimento, utilizzando TurboBlot system (Bio-Rad). La membrana è stata bloccata in una soluzione contenente latte privo di grassi al 5% in TBS-T (0,1% Tween-20, 50 µM Tris-base, 150 µM NaCl – pH 7,5) per 1 ora a temperatura ambiente, ed incubata con l'anticorpo primario, per tutta la notte in camera fredda (4°C), e poi con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi, per 1 ora a temperatura ambiente. Il rilevamento della proteina è stato effettuato mediante chemiluminescenza utilizzando come apparato di scansione il

ChemiDoc (MolecularImager ® ChemiDoc™mod. MP System – BioRadLaboratories), applicando il software ImageLab (ver. 4.1).

Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati sul segnale della β -actina. Sono stati usati i seguenti anticorpi: Mouse Anti-Rac1 (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL), usato alla diluizione di 1:1000, Mouse Anti-Cdc42 (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL), usato alla diluizione di 1:167, Mouse Anti-RhoA (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) usato alla concentrazione di 1:1000, Mouse Anti- β -actina, diluito 1:5000. Anticorpi secondari: Goat Anti Mouse, diluito 1:5000.

7. Saggio pull down

Al fine di valutare lo stato di attivazione delle proteine RhoA, Rac1 e Cdc42, sono stati svolti esperimenti di pull down, utilizzando i kit di rilevamento e seguendo le istruzioni del produttore (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL). I livelli di espressione delle proteine legate a GTP (attive), delle proteine totali (INPUT) e indotte all'attivazione con GTP γ S (GTP stabilizzato), sono stati saggiati mediante analisi western blot, usando gli anticorpi specifici per ogni proteina inclusi nei kit.

8. Saggio di migrazione cellulare

Il saggio di migrazione utilizzato in questo lavoro, noto come “scratch”, è una tecnica che ci permette di analizzare la migrazione direzionale delle cellule *in vitro*. Si basa sulla valutazione della capacità delle

cellule di riformare un monostrato confluyente dopo l'azione meccanica di un taglio eseguito con un puntale sterile.

Cellule BV-2 sono state seminate, alla concentrazione di 1×10^6 su piastre Petri da 35 mm, e coltivate fino alla confluenza. Le cellule confluenti sono state lasciate una notte in terreno di coltura, e, successivamente, è stata introdotta nel monostrato un'area standard priva di cellule (scratch), utilizzando un puntale sterile (Liang *et al.*, 2007). Dopo diversi lavaggi con PBS, alcune piastre sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 30 minuti a 25°C, e fotografate immediatamente dopo lo scratch, rappresentando il controllo al tempo 0. Il DMSO è stato utilizzato come controllo. Altre piastre sono state stimulate con solo URB597 o con solo A β , o con il trattamento combinato di URB597 e A β , per 2, 4, 6 e 24 ore. Al termine delle incubazioni, le cellule sono state osservate al microscopio e fotografate. La migrazione è stata quantizzata misurando la larghezza dello scratch, utilizzando il software Axio Vision, ed i valori ottenuti sono stati riportati in grafico.

9. Analisi con FITC-destrano

Per saggiare la potenzialità fagocitica è stata misurata la capacità di internalizzazione delle molecole di destrano coniugate con FITC. Cellule BV-2 alla concentrazione di 17×10^3 cellule/pozzetto sono state seminate su vetrini di 12 mm di diametro e incubate a 37°C per 24 ore. Le cellule sono state pretrattate con URB597 alla concentrazione di 5 μ M per 4 ore e successivamente stimulate o non con A β 30 μ M in presenza dell'inibitore per 24 ore. Allo scadere del trattamento, le

cellule sono state incubate con 1 mg/ml di FITC-destrano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), in terreno di coltura, per 1 ora, sia a 37°C che a 4°C. Il campione trattato a 4°C è stato utilizzato come controllo negativo. I vetrini sono stati incubati con il colorante DAPI e fotografati al microscopio. L'analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza del destrano e il numero delle cellule destrano-positivo è stata effettuata mediante l'utilizzo del software ImageJ.

10. Real-time PCR quantitativa

L'RNA totale è stato estratto da cellule BV-2, trattate come precedentemente descritto, usando il miRNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) ed è stato quantizzato mediante NanoDrop One/OneC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Il cDNA è stato generato utilizzando il kit the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). La Real Time PCR quantitativa (qPCR) è stata eseguita per ogni campione in triplicato mediante lo strumento Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Cheshire, UK), utilizzando il programma SDS2.1.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e come mix Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). I primers sono stati disegnati con Primer3 software (Rozen, Skaletsky, 2000) (*Tabella 1*). È stato utilizzato un metodo comparativo del ciclo di soglia (Ct) per analizzare i dati PCR in tempo reale, in cui la quantità di target, normalizzata al riferimento endogeno di R18s (ΔCt) e relativa al

calibratore di controllo non trattato ($\Delta\Delta C_t$), è calcolato dall'equazione $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Tabella 1. Primers utilizzati in qPCR

GENE	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
mIL-1 β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
mTNF- α	CTGAACTTCGGGGTGATCGG	GGCTTGTCACCTCGAATTTGAGA
mTGF- β	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
mIL-10	GCCCTTTGCTATGGTGTCTTTC	TCCCTGGTTTCTCTCCCAAGAC
mR18s	AAATCAGTTATGGTTCCTTTGGT C	GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCA A

11. Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm S.D. L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La significatività statistica delle differenze tra i diversi gruppi di trattamento è stata valutata con il test di Tukey-Kramer per confronti multipli, preceduto dall'analisi della varianza a una via (one way ANOVA).

RISULTATI

1. A β non influenza l'attività dell'enzima FAAH

L'enzima FAAH è stato identificato come la principale idrolasi responsabile della degradazione dell'anandamide *in vivo* e, con differenti gradi di efficienza, di altre etanolammidi endogene (Bisogno, Maccarrone, 2013). Le tecniche genetiche e farmacologiche utilizzate per lo studio del sistema endocannabinoide, hanno identificato la FAAH come un promettente bersaglio terapeutico per il trattamento di un'ampia gamma di disturbi infiammatori (Joel *et al.*, 2009). Al fine di determinare l'attività dell'enzima FAAH, in questo lavoro sperimentale è stato eseguito un saggio di attività enzimatica in cellule BV-2 stimulate con A β per 4 e 24 ore. I risultati, presentati in figura 8, mostrano come la stimolazione con A β non influenzi l'attività di questo enzima a nessuno dei tempi analizzati, in quanto statisticamente non significativi.

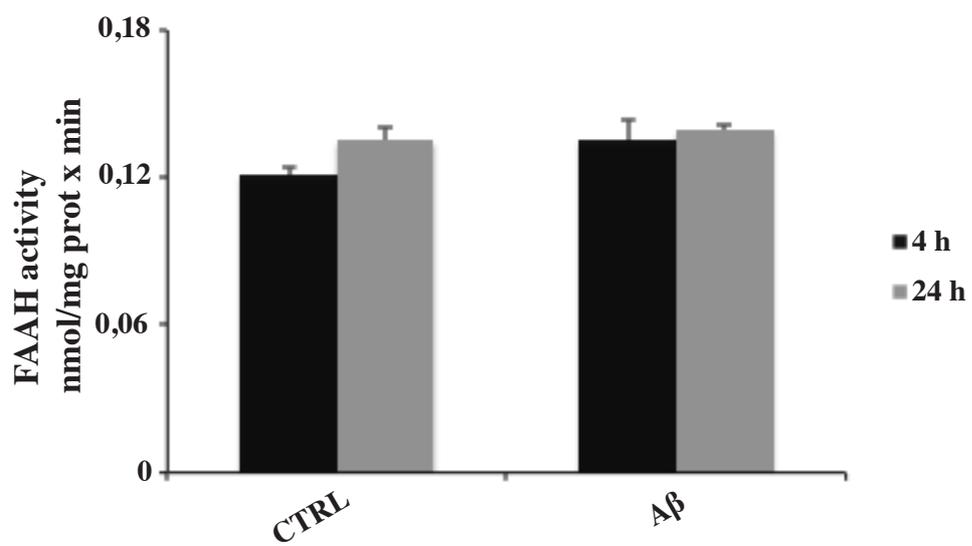


Figura 8. Attività di FAAH in cellule BV-2 stimulate con A β per 4 e 24 ore. I dati sono espressi come la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

2. URB597 non mostra effetti citotossici in cellule BV-2

Per valutare la possibile citotossicità del trattamento URB597 nelle cellule BV-2 e definirne la concentrazione ottimale utilizzabile nelle successive analisi, sono stati allestiti esperimenti di vitalità cellulare utilizzando il saggio colorimetrico MTT.

I risultati ottenuti mostrano che URB597, non sembra avere effetti negativi sulla vitalità cellulare fino a una concentrazione di 10 μM , anche quando il trattamento è protratto per 72 ore (*Fig. 9*), indice che l'inibitore URB597 non interferisce con la capacità di sopravvivenza della cellula.

Pertanto, in tutti gli esperimenti condotti in questa ricerca, è stata utilizzata una concentrazione di URB597 pari a 5 μM , in accordo anche con i dati riportati in letteratura (Piomelli D. *et al.*, 2006).

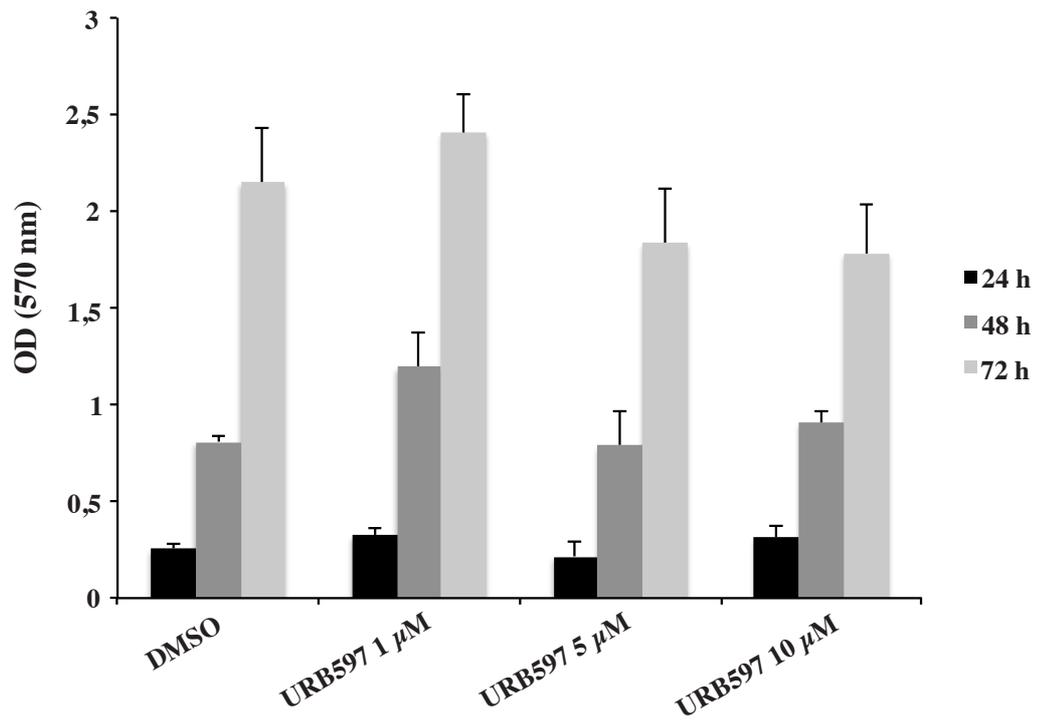


Figura 9. Saggio di vitalità con MTT dell'inibitore URB597 alla concentrazione di 1, 5, e 10 μ M su cellule BV-2 per 24, 48 e 72 ore. I dati sono riportati come densità ottica media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

3. URB597 in combinazione con A β non influenza l'attività mitocondriale di cellule BV-2

Al fine di determinare l'effetto di A β sulla vitalità di cellule BV-2, sono stati effettuati saggi di vitalità con MTT trattando le cellule con A β alla concentrazione di 30 μ M, in presenza o meno dell'inibitore di FAAH a una concentrazione di 5 μ M per 24 e 48 ore. I dati ottenuti mostrano che A β induce una diminuzione della vitalità cellulare di circa il 40% a 24 e 48 ore. Il trattamento con URB597 da solo, non interferisce con la capacità di sopravvivenza della cellula, mentre, in combinazione con A β , non sembra avere influenza sull'attività mitocondriale delle cellule BV-2 (*Fig. 10*).

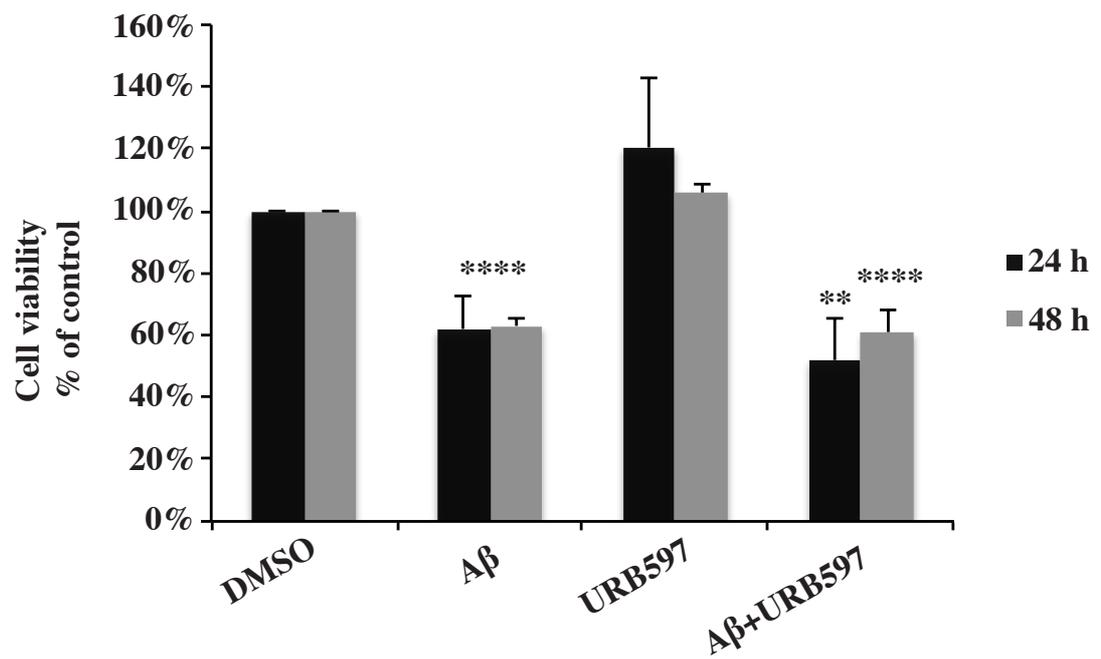


Figura 10. Saggio di vitalità con MTT di cellule BV-2 trattate con A β 30 μ M in presenza o meno di URB597 5 μ M per 24 e 48 ore. I dati, riportati come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti, sono stati normalizzati sul controllo (DMSO) ed espressi in percentuale.

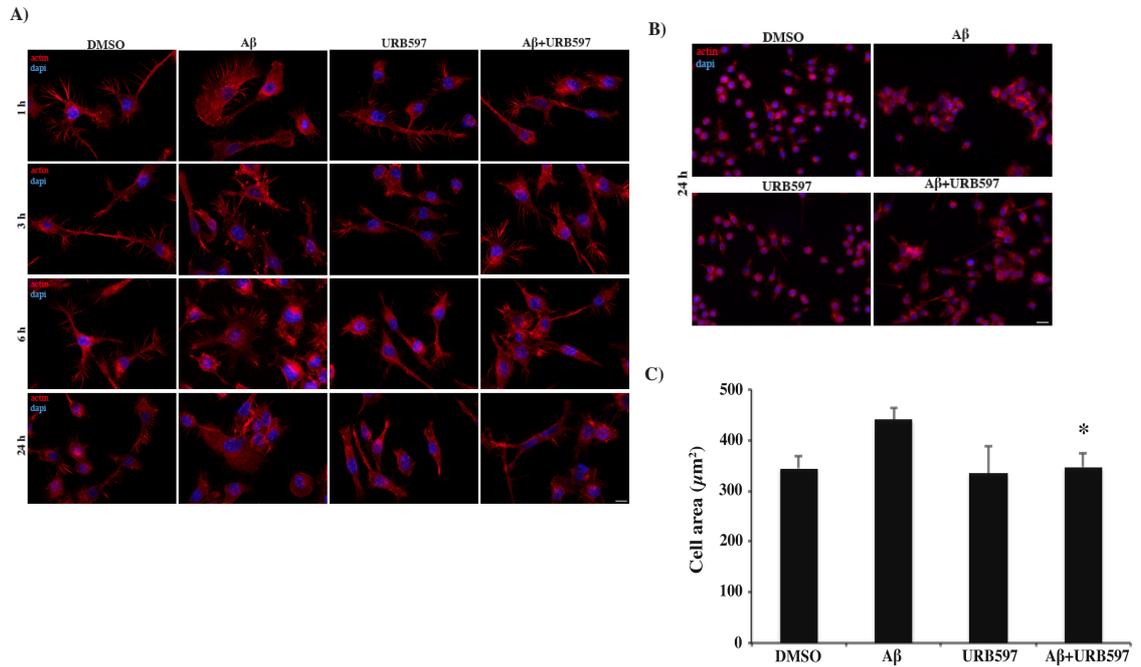
** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ vs DMSO.

4. URB597 reverte le variazioni morfologiche di A β

L'attivazione della microglia comporta l'innescarsi di un'ampia varietà di risposte, tra cui variazioni morfologiche che prevedono l'acquisizione di un fenotipo ameboide (Lucin, Wyss-Coray; 2009). Per verificare se l'inibitore di FAAH avesse degli effetti sulle caratteristiche morfologiche, cellule BV-2 sono state pretrattate con URB597 per 4 ore, e poi stimulate o non con A β per 1, 3, 6 e 24 ore.

In particolare, è stato osservato il citoscheletro di actina utilizzando la falloidina coniugata a rodamina. I risultati della microscopia a fluorescenza mostrano come le cellule di controllo siano caratterizzate da un corpo cellulare molto ridotto. Sono presenti lunghe ramificazioni cellulari e l'actina è organizzata a formare filopodi, utilizzati dalla cellula per esplorare l'ambiente circostante (*Fig. 11 A*). Dopo la stimolazione con A β , a tutti i tempi analizzati, si osserva come le cellule incrementino la loro area di superficie assumendo una morfologia piatta e poligonale, e retraggano i processi altamente ramificati tipici della microglia in forma resting (*Fig. 11 A*). Le cellule trattate con URB597, invece, presentano una morfologia più rotondeggiante, caratterizzata dal restringimento del corpo cellulare e dalla presenza di processi ramificati. Nel trattamento combinato, URB597 è in grado parzialmente di riportare le cellule a un fenotipo più simile a quello delle cellule di controllo (*Fig. 11 A*). Per quantificare questi cambiamenti è stata misurata l'area cellulare espressa in μm^2 (*Fig. 11 C*). L'analisi quantitativa ha confermato che il trattamento con URB597 da solo presenta valori di area simili a quelli delle cellule di controllo, mentre, dopo stimolazione con solo A β , le cellule vanno incontro ad un ingrandimento del soma, infatti l'area cellulare è pari a $440 \mu\text{m}^2$ rispetto ai $340 \mu\text{m}^2$ del campione di controllo. Nel trattamento combinato

URB597 riduce significativamente l'area portandola a valori paragonabili a quelli del controllo (*Fig. 11 C*), indicando la capacità di URB597 di revertire il fenotipo ameboide osservato in presenza di A β .



*Figura 11. (A-B) Analisi morfologica effettuata mediante colorazione della F-actina in cellule BV-2 trattate con URB597 5 μM in presenza o meno di A β 30 μM per 1, 3, 6 e 24 ore. Il DMSO è stato utilizzato come controllo. (B) Immagini rappresentative a minor ingrandimento dell'esperimento svolto a 24 ore. (C) Quantizzazione dell'area cellulare effettuata mediante il software ImageJ. I risultati sono espressi come la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $P < 0,05$ vs A β . Bar 20 μm .*

5. URB597 favorisce l'attivazione della GTPasi Cdc42

La plasticità del citoscheletro di actina e le conseguenti modificazioni morfologiche sono regolate da proteine appartenenti alla famiglia Rho GTPasi. Le proteine Rho sono proteine a basso peso molecolare appartenenti alla superfamiglia Ras (Ridley, 2013). La famiglia Rho comprende: Rho (A, B, C), Rac (1, 2), Cdc42, TC 10, Rho D, Rho E, Rho G, e TTF (Ridley, 2003; Ridley, 2006; Ridley, 2013).

I membri della famiglia Rho sono piccole proteine dal peso molecolare di 21-25 kDa, esistono in due forme alternative: una conformazione attiva, che lega il GTP, ed una conformazione inattiva, che lega il GDP. Il fattore di scambio dei nucleotidi guanidici (GEF) promuove il rilascio del GDP, permettendo al GTP di legarsi e quindi indurre l'attivazione della molecola. La dissociazione del GDP e il successivo legame del GTP, porta ad un cambio conformazionale della regione di legame che interagisce con gli effettori a valle, quali chinasi, fosfolipasi, regolatori dell'actina e adattatori molecolari (Jaffe e Hall, 2005; Ridley, 2011), per indurre diverse risposte cellulari (Schmitz *et al.*, 2000; Ridley, 2013). In particolare, in questa ricerca sono stati presi in considerazione tre membri della famiglia delle Rho GTPasi: RhoA, Rac1 e Cdc42. RhoA, controlla la formazione delle fibre da stress e nuove adesioni focali, Rac1 stimola l'estensione dei lamellipodi, Cdc42 determina la direzione del movimento regolando la formazione di filopodi (Ridley, 2013). Queste proteine, oltre a regolare la riorganizzazione del citoscheletro, sono coinvolte, inoltre, nel signaling cellulare e nella regolazione della trascrizione (Ridley, 2013).

Al fine di determinare i livelli di espressione delle proteine RhoA, Rac1 e Cdc42, sono stati condotti esperimenti di western blot pretrattando cellule BV-2 con URB597 per 4 ore in presenza o meno di A β per 24

ore. L'analisi densitometrica mostra come nessuno dei trattamenti induca una variazione significativa nei livelli di espressione delle proteine prese in esame (*Fig. 12*).

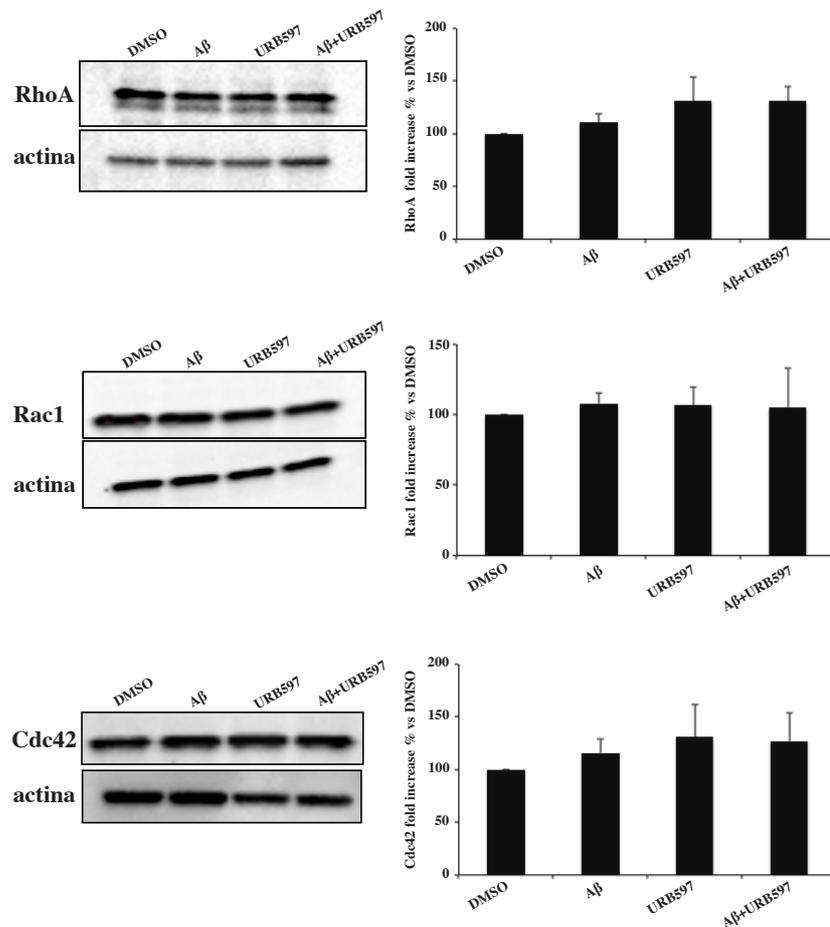


Figura 12. Livelli di espressione delle proteine RhoA, Rac1 e Cdc42 analizzati mediante western blot in cellule BV-2 trattate con URB597 5 μ M in presenza o meno di A β 30 μ M per 24 ore. I risultati sono stati normalizzati sul segnale della β -actina, riportati in percentuale, normalizzando sul DMSO, utilizzato come controllo. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

Per meglio comprendere la relazione fra queste proteine e il rimodellamento dell'actina citoscheletrica, è stata esaminata la loro attività GTPasica mediante saggio di pull down. L'analisi densitometrica relativa alle proteine RhoA e Rac1, mostra che il trattamento di cellule BV-2 con URB597 induce una diminuzione dell'espressione di queste proteine in forma attiva (*Fig. 13 A-B*). La stimolazione con A β , invece, non influisce sui livelli di espressione della proteina RhoA attiva, mentre riduce l'attivazione della proteina Rac1 (*Fig. 13 A-B*). L'analisi densitometrica della proteina Cdc42 mostra come sia la stimolazione con A β che il trattamento con URB597 inducano un aumento significativo della proteina in forma attiva (*Fig. 13 C*).

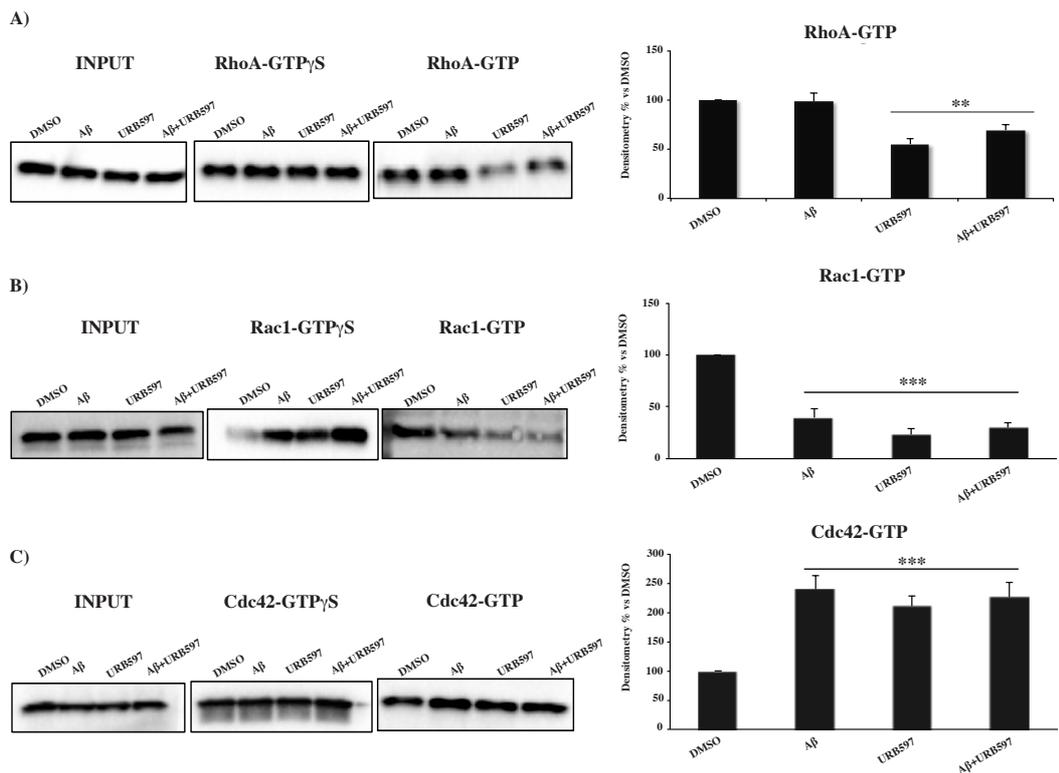


Figura 13. Attività GTPasica delle proteine RhoA (A), Rac1 (B) e Cdc42 (C) analizzata mediante saggio pull down, in cellule BV-2 trattate con URB597 5 μ M in presenza o meno di A β 30 μ M per 24 ore. I risultati sono stati normalizzati sull'input, riportati in percentuale, normalizzando sul DMSO, utilizzato come controllo. I dati sono la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

** $P < 0,01$ vs DMSO, *** $P < 0,001$ vs DMSO.

6. URB597 riduce la migrazione microgliale

Uno degli aspetti dell'attivazione delle cellule microgliali è l'acquisizione di un fenotipo migratorio, fondamentale affinché le cellule si dirigano verso il sito dell'insulto. Al fine di valutare l'effetto di URB597 sulla migrazione, cellule BV-2 sono state sottoposte ad un saggio di migrazione cellulare detto scratch. Le cellule sono state pretrattate con URB597 per 4 ore in presenza o assenza di A β per 2, 4, 6 e 24 ore. Come punto di partenza è stato considerato il campione indicato come T0, ossia quello ottenuto subito dopo l'introduzione del solco privo di cellule. Le cellule trattate con DMSO rappresentano il campione di controllo ad ogni tempo di stimolazione. La migrazione è stata quantizzata misurando la larghezza dello scratch, ed i valori ottenuti sono stati normalizzati e riportati in grafico in percentuale. Dai risultati ottenuti si osserva come il trattamento con URB597 non sembri indurre migrazione, infatti l'ampiezza del solco, rimane simile a quella delle cellule di controllo per ogni tempo considerato (*Fig. 14*). Il trattamento con A β induce migrazione già dopo 2 ore di stimolazione, infatti, si ha una riduzione della larghezza del solco di circa il 20% rispetto alle cellule di controllo, che si mantiene proporzionale nel tempo (*Fig. 14, grafico*). L'aggiunta di URB597 ai campioni con A β riduce significativamente l'effetto migratorio di A β (*Fig. 14*).

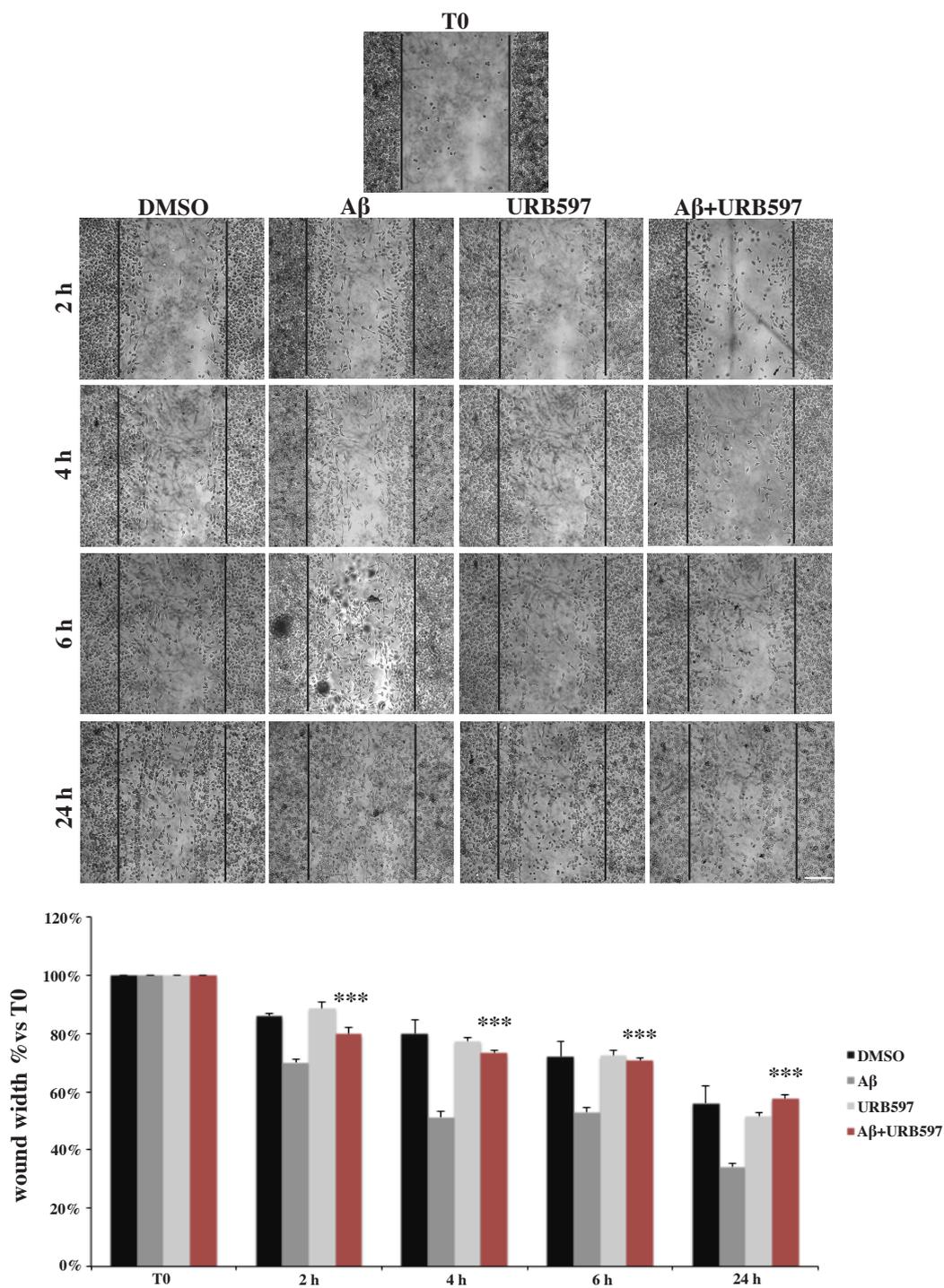


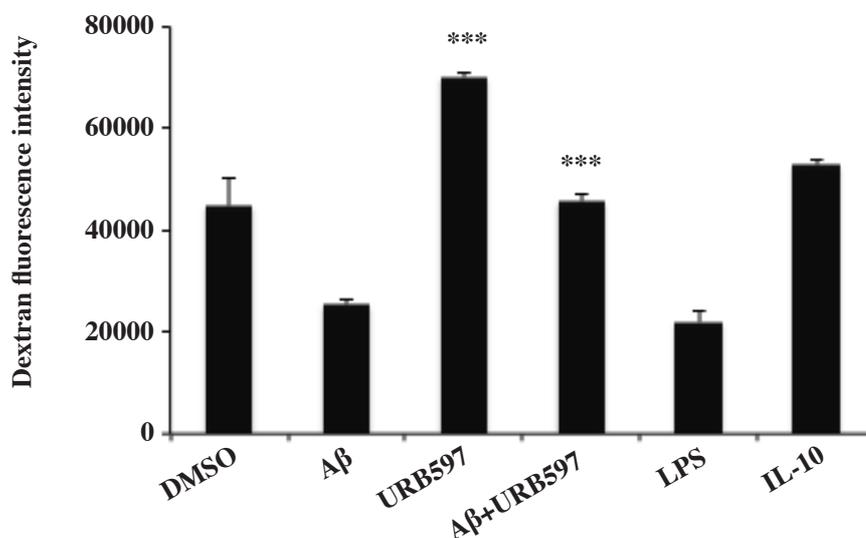
Figura 14. Analisi della migrazione cellulare mediante saggio di scratch. Cellule BV-2 sono state trattate con URB597 5 μ M in presenza o meno di A β 30 μ M per 2, 4, 6 e 24 ore. T0 rappresenta il controllo di partenza, DMSO il controllo ad ogni tempo. I risultati normalizzati al campione T0 e riportati in percentuale, sono la media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. *** $P < 0,001$ vs A β . Bar 200 μ m.

7. URB597 aumenta la capacità fagocitica microgliale

Dal momento che l'acquisizione del fenotipo alternativo M2 prevede che la cellula assuma capacità fagocitica, è stato valutato l'effetto di URB597 sul processo di fagocitosi. Cellule BV-2, trattate con URB597 per 4 ore in presenza o meno di $A\beta$ per 24 ore, sono state incubate per 1 ora con FITC-destrano. Come da letteratura, la stimolazione con LPS, è stata utilizzata come controllo negativo della fagocitosi, mentre, la stimolazione con IL-10, come controllo positivo. È stata quantizzata, quindi, la capacità delle cellule di inglobare particelle di FITC-destrano e il numero di cellule destrano-positivo. Nel grafico A della figura 15 è stata riportata l'intensità del destrano fluorescente in seguito ai vari trattamenti. I risultati mostrano come, dopo stimolazione con $A\beta$, la capacità delle cellule di inglobare destrano è significativamente ridotta rispetto al DMSO e paragonabile al campione stimolato con LPS. Dopo trattamento con solo URB597, invece, il valore di intensità risulta paragonabile a quello ottenuto stimolando le cellule con IL-10, e, nel trattamento combinato di URB597 e $A\beta$, l'inibitore è significativamente in grado di aumentare il valore di intensità rispetto alla stimolazione con solo $A\beta$ (*Fig. 15 A*). Nel grafico B della figura 15 è stato quantizzato il numero di cellule destrano-positivo sul totale ed i risultati sono riportati in percentuale. Dopo stimolazione con $A\beta$, così come con LPS, si ha una riduzione del numero di cellule destrano-positivo di circa l'80% rispetto al DMSO. Il trattamento con solo URB597, invece, presenta valori simili a quelli di controllo ma inferiori a quelli ottenuti stimolando le cellule con IL-10. Nel trattamento combinato di URB597 e $A\beta$, l'inibitore aumenta significativamente il numero di cellule destrano-positivo, la percentuale di cellule in

fagocitosi, infatti, ha valori estremamente più alti rispetto al campione stimolato con solo A β (*Fig. 15 B*).

A)



B)

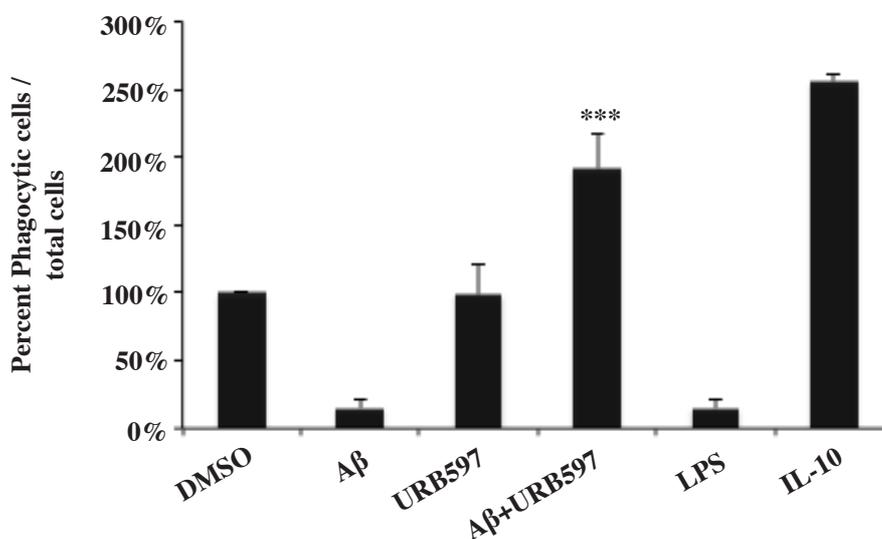


Figura 15. Analisi del processo di fagocitosi mediante utilizzo del FITC-destrano in cellule BV-2 trattate con URB597 5 μ M in presenza o meno di A β 30 μ M per 24 ore. A) Quantizzazione dell'intensità del FITC-destrano. B) Quantizzazione del numero di cellule destrano-positivo sul totale; i dati sono stati normalizzati sul DMSO e riportati in percentuale.

I risultati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti.

*** $P < 0,001$ vs A β .

8. URB597 e A β inducono up-regolazione della proteina Iba1

La proteina Iba1 (Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1) conosciuta anche con il nome AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor 1), è il marcatore selettivo della microglia più comunemente utilizzato, in quanto la sua espressione è strettamente ristretta ai macrofagi/microglia (Imai *et al.*, 1996). Viene espressa uniformemente nel citoplasma e lungo i processi ramificati di queste cellule (Kirik *et al.* 2010). Prende parte alla riorganizzazione del citoscheletro, legando molecole di actina e portando alla formazione dei microfilamenti (Sasaki *et al.* 2001). Vari studi hanno dimostrato che Iba1 viene up-regolata durante l'attivazione microgliale, in seguito a insulti a livello del SNC (Ito *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2000). Al fine di determinare la localizzazione della proteina Iba1, cellule BV-2 sono state sottoposte ad esperimenti di immunofluorescenza, dopo trattamento con URB597 per 4 ore in presenza o meno di A β per 24 ore. Le immagini di immunofluorescenza mostrano una localizzazione della proteina a livello citoplasmatico e lungo le ramificazioni cellulari, la cui intensità sembra aumentare dopo i trattamenti (*Fig. 16*). La quantizzazione dell'intensità del segnale di fluorescenza conferma come, sia la stimolazione con soli A β e URB597, che il trattamento combinato, inducano un significativo aumento dell'espressione della proteina Iba1 (*Fig. 16, grafico*), indicando una up-regolazione della stessa.

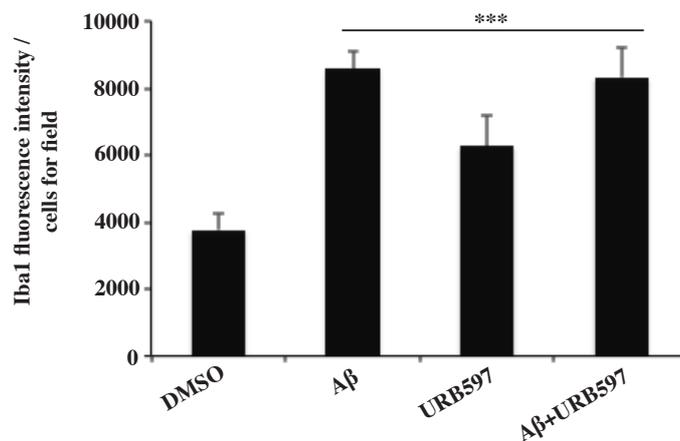
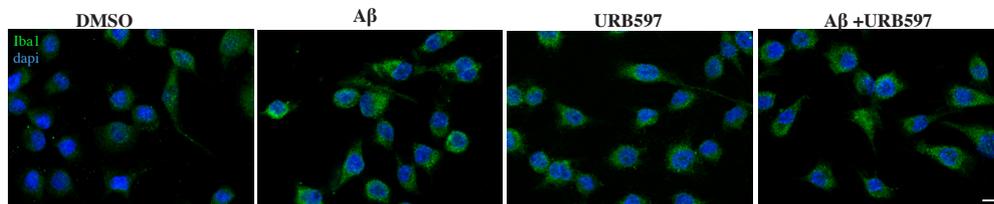


Figura 16. Analisi di immunofluorescenza del marcatore selettivo Iba1 in cellule BV-2 trattate con URB597 5 μ M in presenza o meno di A β 30 μ M per 24 ore. Il DMSO è stato utilizzato come controllo. Quantizzazione dell'intensità del segnale di fluorescenza mediante il software ImageJ. I risultati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. *** $P < 0,001$ vs DMSO. Bar 20 μ m.

9. URB597 riduce l'espressione di iNOS inducendo quella di Arg-1

L'attivazione della microglia è un processo polarizzato che può portare da un lato ad un'attivazione classica M1, potenzialmente neurotossica, e dall'altro ad un'attivazione alternativa M2, potenzialmente neuroprotettiva. Al fine di valutare il fenotipo di attivazione, cellule BV-2, trattate con URB597 per 4 ore in presenza o meno di A β per 24 ore, sono state sottoposte ad un esperimento di immunofluorescenza, utilizzando due marcatori di polarizzazione M1/M2, rispettivamente iNOS e Arg-1. LPS e IL-4 sono stati utilizzati come controlli positivi rispettivamente per i marcatori iNOS e Arg-1. I risultati ottenuti mostrano come la stimolazione con A β induca una significativa espressione del marcatore iNOS (*Fig. 17*). Dopo trattamento con solo URB597 non viene influenzata l'espressione di nessuno dei due marcatori utilizzati. Dopo trattamento combinato, invece, URB597 sembra in grado di ridurre significativamente l'espressione del marcatore iNOS e indurre quella del marcatore Arg-1 (*Fig. 17*). I risultati delle immagini di immunofluorescenza sono confermati dall'analisi quantitativa, svolta misurando l'intensità del segnale di fluorescenza mediante il software ImageJ (*Fig. 17, grafici*).

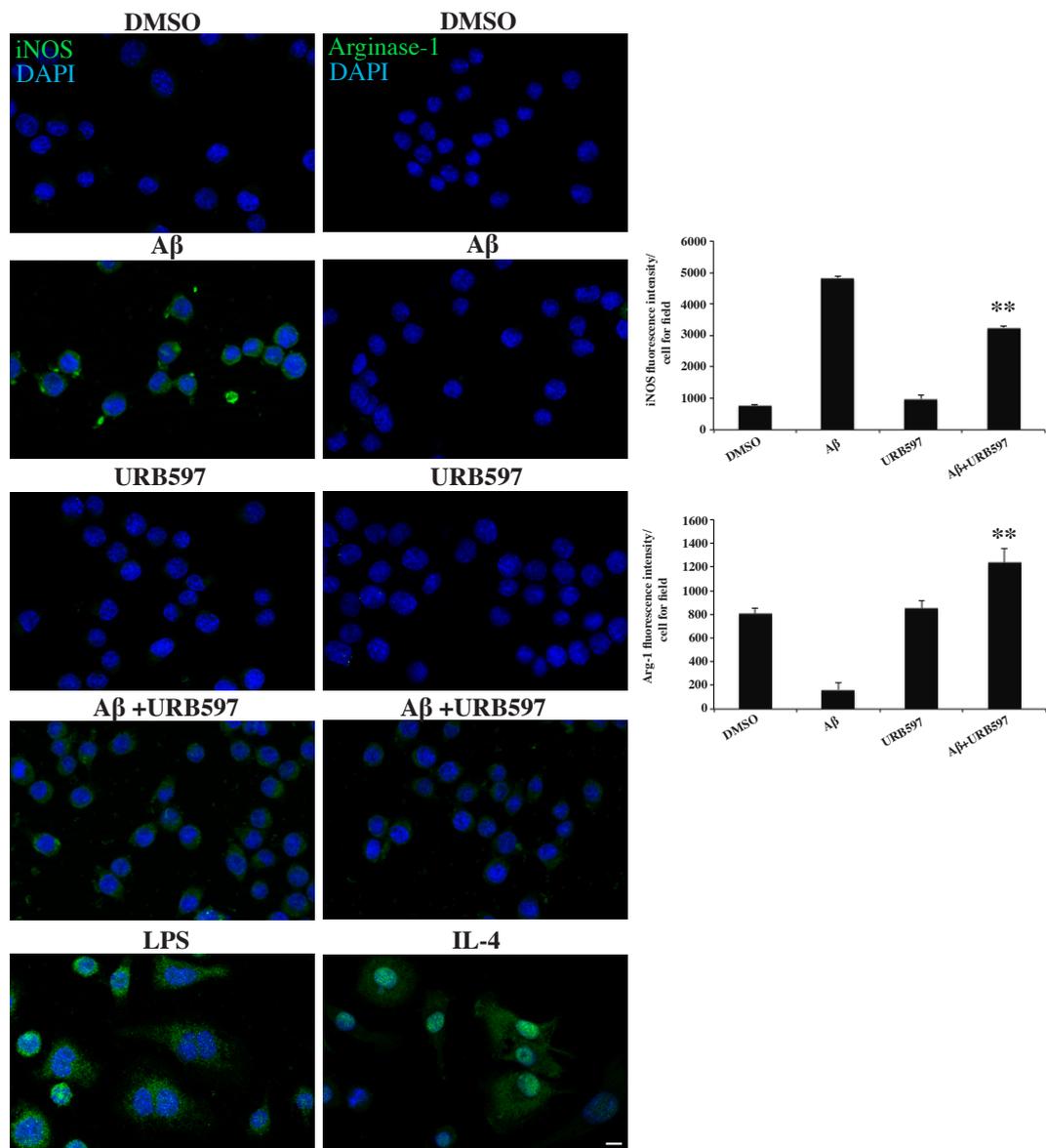


Figura 17. Analisi di immunofluorescenza dei marcatori di polarizzazione M1/M2, iNOS e Arg-1. Cellule BV-2 sono state trattate con URB597 5μM in presenza o meno di Aβ 30 μM per 24 ore. LPS e IL-4 sono stati utilizzati come controlli positivi. Quantizzazione dell'intensità del segnale di fluorescenza mediante il software ImageJ. I risultati sono espressi come media ± SD di tre esperimenti indipendenti.

** $P < 0,01$ vs Aβ. Bar 20 μm.

10. URB597 riduce l'espressione degli mRNA per IL-1 β e TNF- α aumentando quella per TGF- β e IL-10

L'acquisizione del fenotipo classico M1 e del fenotipo alternativo M2 è caratterizzata dalla produzione di molecole, rispettivamente, pro e anti-infiammatorie.

Per valutare se si verificasse una variazione dell'espressione genica di molecole pro e anti-infiammatorie, mediante qPCR, nel mio sistema sperimentale sono stati saggiati i livelli di espressione degli mRNA di alcune citochine. Cellule BV-2 sono state trattate con URB597 per 4 ore in presenza o meno di A β per 1, 6 e 24 ore. Sono state prese in esame le citochine pro-infiammatorie IL-1 β e TNF- α e quelle anti-infiammatorie TGF- β e IL-10. I risultati presentati in figura 17 A-B, mostrano come, dopo stimolazione con A β , ci sia un aumento nell'espressione degli mRNA per le citochine IL-1 β e TNF- α con picco di espressione ad 1 ora, mentre, il trattamento con URB597 da solo, non induce alcun cambiamento significativo. Nel trattamento combinato di A β e URB597, invece, dopo 1 ora si ha una significativa riduzione dell'espressione di entrambe le citochine rispetto al campione stimolato con solo A β . In figura 18 C-D, sono mostrati i risultati ottenuti per le citochine anti-infiammatorie e vediamo come, dopo trattamento con solo URB597, sia evidente un picco di espressione dell'mRNA per il TGF- β a 24 ore, mentre, per IL-10 il picco massimo di espressione è dopo 1 ora di trattamento.

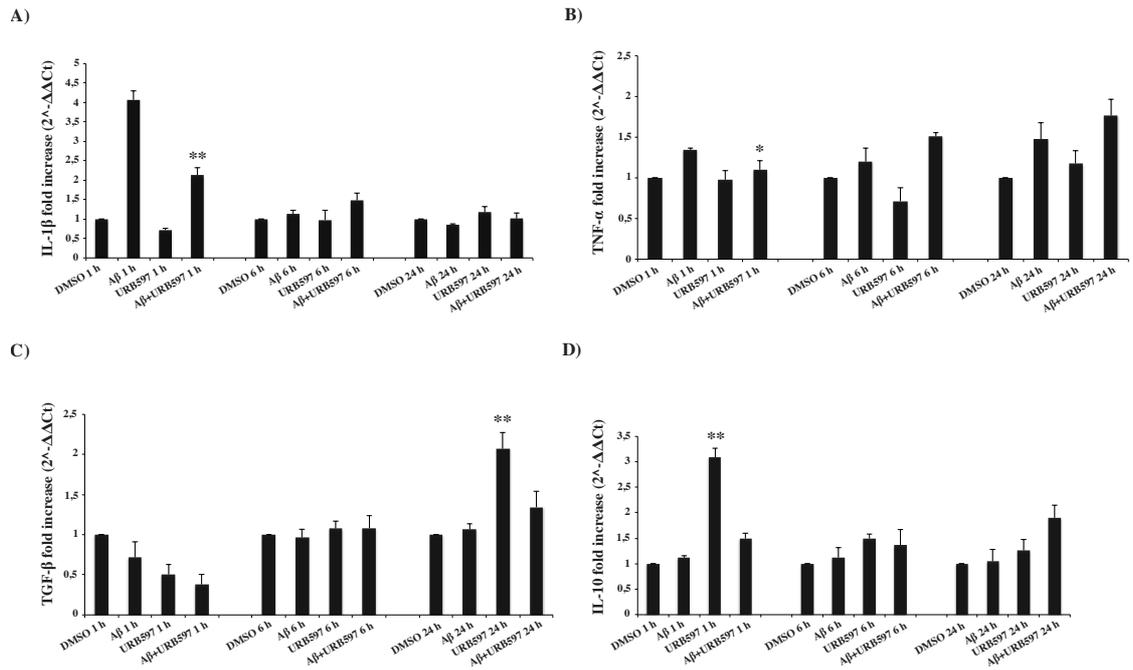


Figura 18. Livelli di espressione degli mRNA per le citochine pro e anti-infiammatorie saggiati mediante qPCR, in cellule BV-2 trattate con URB597 5 μM in presenza o meno di A β 30 μM per 1, 6 e 24 ore. A-B) Espressione degli mRNA per IL-1 β e TNF- α . ** $P < 0,01$ vs A β , * $P < 0,05$ vs A β . C-D) Espressione degli mRNA per TGF- β e IL-10. ** $P < 0,01$ vs DMSO

DISCUSSIONE

Nonostante i recenti progressi nella comprensione dei processi di neurodegenerazione che sono alla base della malattia di Alzheimer, ad oggi non sono ancora disponibili farmaci in grado di modificarne il decorso clinico. Le strategie terapeutiche attuali sono finalizzate esclusivamente ad alleviarne i sintomi ed a rallentarne il decorso. Per tale motivo, vi è dunque la necessità di introdurre in terapia nuove molecole in grado di intervenire sui meccanismi fisiopatologici alla base di questa malattia. Si ritiene che le cellule gliali, come la microglia, giochino un ruolo cruciale nello sviluppo di questa patologia, poiché mentre in condizioni fisiologiche svolgono una funzione di supporto per i neuroni, se attivate vanno incontro ad una serie di modificazioni, sia a livello morfologico che funzionale, che possono contribuire ad esacerbare il danno neuronale (Lam *et al.*, 2001). In questo scenario, il sistema endocannabinoide sta suscitando notevole interesse, motivato dai numerosi effetti neuroprotettivi descritti in letteratura. Diversi studi sperimentali attribuiscono al sistema endocannabinoide un possibile ruolo neuroprotettivo nei confronti di diverse situazioni patologiche coinvolte nella patogenesi della malattia di Alzheimer, tra cui l'infiammazione (Jackson *et al.*, 2005). Di qui l'importanza di andare ad investigare il ruolo di molecole correlate al sistema endocannabinoide nella modulazione del processo di attivazione microgliale, in particolare gli effetti della molecola URB597 come inibitore dell'enzima FAAH.

Nel mio sistema sperimentale, l'attività dell'enzima FAAH non viene influenzata dalla stimolazione con A β , e, URB597 non interferisce con la capacità di sopravvivenza della cellula. In trattamento combinato con

A β , non ha influenza sull'attività mitocondriale, in quanto non mostra un effetto sinergico con la riduzione della vitalità ottenuta dopo stimolazione con A β . In condizioni neuropatologiche o in presenza di agenti infettivi, la microglia va incontro ad una rapida attivazione, adottando un fenotipo ameboide (Hanisch, Kettenmann, 2007). Ciò è riscontrabile stimolando le cellule con A β , ma non con URB597, che nel trattamento combinato è in grado di revertire il fenotipo ameboide alla forma ramificata tipica della microglia resting.

La plasticità del citoscheletro di actina è regolata dalle proteine della famiglia Rho GTPasi, in particolare RhoA, Rac1 e Cdc42. Nel mio sistema sperimentale non risultano variazioni nei livelli di espressione totale di queste proteine, è evidente, invece, una up-regolazione della forma attiva della proteina Cdc42 dopo i vari trattamenti. Cdc42 regola l'organizzazione del citoscheletro, ed è coinvolta anche in processi fisiologici quali motilità e fagocitosi. Migrazione e fagocitosi sono caratteristiche, rispettivamente, dei fenotipi di attivazione M1 pro-infiammatorio e M2 anti-infiammatorio. La microglia di tipo M1, migra verso il sito di insulto promuovendo e sostenendo lo stato infiammatorio (Bollmann *et al.*, 2015), la microglia di tipo M2 assume capacità fagocitica e partecipa ai processi di soppressione dello stato infiammatorio (Garden *et al.*, 2006). Valutando l'effetto di URB597 su questi processi, ho ottenuto una riduzione della migrazione e un aumento del numero di cellule in fagocitosi. Vari studi hanno identificato un ruolo cruciale della proteina Cdc42 nell'indurre cambiamenti morfologici in cellule di microglia trattate con fattori trofici solubili come il CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1), prodotti dalle cellule mesenchimali. È probabile che questi cambiamenti di forma siano mediati da vie di segnalazione avviate principalmente da

PI3K/Akt e da ERK1/2 (Neubrand *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2012; Tarassishin *et al.*, 2011). Nei macrofagi e in altri tipi di cellule, la fosforilazione di PI3K e ERK1/2, porta all'attivazione di Rho GTPasi, con conseguente polimerizzazione dell'actina, necessaria all'induzione di processi come la migrazione cellulare (Bourette e Rohrschneider, 2000; Lo *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2003; Pixley, 2012; Smith *et al.*, 2008). Su e collaboratori hanno mostrato, inoltre, che il trattamento con URB597, in modelli murini di iperfusione cronica cerebrale (CCH), promuove la sopravvivenza neuronale mediante l'attivazione del pathway PI3K/Akt (Su *et al.*, 2016). Probabilmente anche nel mio sistema sperimentale URB597, attraverso la via di segnalazione PI3K/Akt, porterebbe all'attivazione di Cdc42, che mediante il reclutamento di proteine effettrici (Ridley, 2011), indurrebbe polimerizzazione dell'actina con cambiamenti nella morfologia cellulare legati a processi fisiologici come motilità e fagocitosi. In questo scenario risulta di fondamentale importanza la correlazione tra morfologia e funzione della microglia. Oltre l'aspetto morfologico ed i processi legati alla riorganizzazione del citoscheletro di actina, i fenotipi di attivazione M1/M2 si caratterizzano per la produzione di molecole pro-e anti-infiammatorie. Come marcatori di attivazione microgliale, in questo studio sono stati esaminati Iba1, i marcatori specifici di polarizzazione M1/M2, rispettivamente iNOS e Arg-1, e citochine pro-e anti-infiammatorie. I risultati che ho ottenuto hanno mostrato una up-regolazione del marcatore Iba-1 in seguito ad ogni trattamento utilizzato. Ciò potrebbe essere dovuto alla capacità della proteina di legare i microfilamenti di actina (Ohsawa *et al.*, 2004). È stato mostrato, infatti, il suo coinvolgimento nei processi di fagocitosi e motilità, partecipando specificatamente alla riorganizzazione

dell'actina regolata dalle proteine Rho GTPasiche (Ohsawa *et al.*, 2000; Imai, Kohsaka 2002; Kanazawa *et al.*, 2002). URB597, inoltre, è in grado di ridurre l'espressione del marcatore iNOS, rilevabile dopo stimolazione con A β , inducendo quella di Arg-1. I dati sono in accordo con vari studi, tra cui quello di Tham e collaboratori, nel quale è mostrata la capacità di URB597, in trattamento combinato con LPS, di ridurre l'espressione dell'enzima iNOS, in colture primarie di microglia e in cellule BV-2 (Tham *et al.*, 2007), e lo studio di Su e collaboratori che hanno mostrato una riduzione del marcatore iNOS dopo trattamento con URB597 in modelli murini di iperfusione cronica cerebrale (CCH) (Su *et al.*, 2017).

I miei dati di qPCR, indicano che l'inibitore URB597, in trattamento combinato con A β , riduce l'espressione dell'mRNA per le citochine pro-infiammatorie TNF- α e IL-1 β mentre, da solo, induce quella per le citochine anti-infiammatorie TGF- β e IL-10. Questo risultato è in linea con gli esperimenti di Tanaka e collaboratori, che hanno mostrato come l'inibizione dell'enzima FAAH, mediante trattamento con URB597, sopprima l'espressione di diversi geni pro-infiammatori in cellule BV-2 stimulate con LPS (Tanaka *et al.*, 2019).

Il presente studio, in accordo con la letteratura, mostra come la microglia in forma ameboide, secerna livelli significativi di citochine infiammatorie non rilevabili nella forma ramificata (Saijo, Glass, 2011; Tokizane *et al.*, 2017).

In conclusione, i risultati di questa ricerca suggeriscono che URB597 è in grado di dirigere la polarizzazione microgliale verso il fenotipo M2 anti-infiammatorio. Quindi, inibire selettivamente la degradazione degli endocannabinoidi, andando a modulare il processo di attivazione

microgliale, rappresenta una promettente possibilità terapeutica in disturbi neurologici dove la neuroinfiammazione svolge un ruolo fondamentale.

BIBLIOGRAFIA

Akiyama H, Arai T, Kondo H, Tanno E, Haga C, and Ikeda K. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2000 14 Suppl 1, S47-S53.

Alexander JP, Cravatt BF. Mechanism of Carbamate Inactivation of FAAH: Implications for the Design of Covalent Inhibitors and In Vivo Functional Probes for Enzymes. *Chem Biol.* 2005, 12: pp. 1179–1187

Ali, Ghouri, Ans, Akbar, Toheed. Recommendations for Anti-inflammatory Treatments in Alzheimer's Disease: A Comprehensive Review of the Literature. *Cureus.* 2019, 11(5): e4620

Atherton E, Sheppard RC. Solid Phase Synthesis – A Practical Approach. *IRL Press at Oxford University Press USA.* 1989 p. 203

Bahr BA, Karanian DA, Makanji SS, Makriyannis A. Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* 2006, 15:351–365

Benito C, et al. Cannabinoid CB2 Receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci.* 2003, 23, 11136-11141

Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are

selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*. 2003, 23: 11136–11141

Bisogno T, Di Marzo V. The role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: Facts and hypotheses. *Current Pharmaceutical Design*. 2008, 14, 2299–3305

Bisogno T, Maccarone M. Latest advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Expert Opin. Drug. Discov.* 2013

Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, et al. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol*. 1990, 27: 229-23

Block ML, and Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*. 2005, 76(2): 77-98

Boche D, Perry VH, and Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2013, 39,3–18

Bok D. Evidence for an inflammatory response in age-related muscular degeneration gains new support. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102:70543-70544

Bollmann L, Koser DE, Shahapure R, Gautier HO, Holzapfel GA, Scarcelli G, Gather MC, Ulbricht E, Franze K. Microglia

mechanics: immune activation alters traction forces and durotaxis. *Front Cell Neurosci.* 2015, 9:363

Bourette RP, Rohrschneider LR. Early events in M-CSF receptor signaling. *Growth Factors.* 2000, 17:155–166

Burkey TH, Quock RM, Consroe P, Ehlert FJ, Hosohata Y, Roeske WR, Yamamura HI. Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur J Pharmacol.* 1997, 336(2-3):295-8

Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol.* 2008, 153(2):240-51. Review

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 1998, 394(6690):277-81

Cascio MG, Minassi A, Ligresti A, Appendino G, Burstein S, Di Marzo V. A structure-activity relationship study on N -arachidonoyl-amino acids as possible endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004

Chen R, et al. Monoacylglycerol Lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 2012, 2, 1329-1339

D'Addario C, et al. Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease. *PLoS ONE.* 2012, 7, e39186

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury. In vivo. *Nat. Neurosci.* 2005, 8,752–758

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988, 34(5):605-13

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988, 34(5):605-13

Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T, Melck D. Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: an historical overview and some recent developments. *Lipids.* 1999, 34 Suppl: S319-25. Review

Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997, 56(4):321-39

Egertová M, Elphick MR. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol.* 2000, 422(2):159-71

Eikelenboom P, Rozemuller JM, Kraal G, Stam FC, McBride PA, Bruce ME, Fraser H. Cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease but not in scrapie-affected mice are closely associated with a local inflammatory process. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. MolPathol.* 1991, 60:329-336)

Eikelenboom P, Zhan SS, van Gool WA, Allsop D. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994, 15:447-450

Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 1990, 248: 1122–1124

Fezza F, et al. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Mol. Basel. Switz.* 2014, 19,17078-17106

Fisher O. Die presbyophrene Demenz, deren anatomische Grundlage und klinische Abgrenzung. *Z Ges Neurol Psychiatry.* 1910, 3:371–471

Folch, Busquets, Ettcheto, Sánchez-López, Castro-Torres, Verdaguer, Garcia, Olloquequi, Casadesús, Beas-Zarate, Pelegri, Vilaplana, Auladell, Camins. Memantine for the treatment of dementia: a review on its current and future applications. *J. Alzheimer's Dis.* 2018, pp. 1223-1240

Garden GA, Möller T. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006, 1:127-137

Ginhoux F, Prinz M. Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015, 7:a020537

Glass M, Northup JK. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol.* 1999, 56(6):1362-9

Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991, 349:704–706

Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proceeding of National Academy of Sciences of the USA.* 2005, 102(51): 18620-5

Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1999, 57(4):417-23

Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ. Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann NY Acad Sci.* 1993, 695: 109–116

Haass C. Take five—BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 2004, 23: 483–488

Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007, 10:1387–1394

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature.* 2013, 493,674–678

Henn A, Lund S, Hedtjarn M, Schrattenholz A, Porzgen P, and Leist M. The suitability of BV2 cells as an alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX.* 2009, 26(2): 83-94

Hui CW, Zhang Y, Herrup K. Non-Neuronal Cells Are Required to Mediate the Effects of Neuroinflammation: Results from a Neuron-Enriched Culture System. *PLoS One.* 2016, 20;11(1):e0147134

Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog. lipid Res.* 2016, 62: 107-28

Imai Y and Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia.* 2002, 40, 164–174

Imai Y, Iyata I, Ito D, Ohsawa K and Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 224, 855–862

Itagaki S, Mcgeer PL, Akiyama H, et al. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of alzheimer-disease. *Journal of neuroimmunology.* 1989, 24: 173-182

Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y and Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998, 57, 1–9

Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T and Fukuuchi Y. Enhanced expression of *Iba1*, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke.* 2001, 32, 1208–1215

Jackson SJ, Diemel LT, Pryce G, Baker D. Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J Neurol Sci.* 2005, 233: 21–25

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005, 21: 247-269

Joel E. Schlosburg, Steven G. Kinsey, and Aron H. Lichtman. Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) to Treat Pain and Inflammation. *The AAPS Journal.* 2009, Vol. 11, No. 1

Joel E. Schlosburg, Steven G. Kinsey, and Aron H. Lichtman. Targeting Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) to Treat Pain and Inflammation. *The AAPS Journal*. 2009, Vol. 11, No. 1

Jung, KM, et al. An amyloid β 42-dependent deficit in anandamide mobilization is associated with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2012, 33, 1522-1532

Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S and Imai Y. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-c-dependent pathway. *J. Biol. Chem*. 2002, 277, 20026–20032

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. 2003, 9: pp. 76-81

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, and Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev*. 2011, 91,461-553

Kettenmann H, Kirchhoff F, and Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013, 77,10–18

Kirik OV, Sukhorukova EG, Korzhevskii DE. Calcium-binding Iba-1/AIF-1 protein in rat brain cells. *Morfologiya*. 2010, 137(2):5-8

Kitazawa M, Yamasaki TR and Laferla FM. Microglia as a potential bridge between the amyloid beta-peptide and tau. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, 1035: 85-103

Kuehn BM. Inflammation suspected in eye disorders. *The Journal of American Medical Association.* 2005, 294: 31-32

Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NfkappaB. *Neurobiol aging.* 2001, 22 (5): 765-72

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007, 2(2):329-33

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001, 25(4):402-8

Lo AS, Taylor JR, Farzaneh F, Kemeny DM, Dibb NJ, Maher J. Harnessing the tumour-derived cytokine, CSF-1, to co-stimulate T-cell growth and activation. *Mol Immunol.* 2008, 45:1276–1287

Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little?. *Neuron.* 2009, 64(1):110–22

Martin S, Vincent J-P, Mazella J. Involvement of the neurotensinreceptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci.* 2003, 23:1198–1205

Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE. Beta- Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1993, 16(10): 409-14

Mayeux R, Sano M. Drug therapy - Treatment of Alzheimer's disease. *New england journal of medicine.* 1999, 341: 1670-1679

McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Neuroimmune mechanisms in Alzheimer disease pathogenesis. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1994, 8: 149-158

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995, 50(1):83-90

Melinda E, Lull and Michelle L. Block. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics.* 2010, 7(4):354-65

Mori I, Imai Y, Kohsaka S and Kimura Y. Upregulated expression of Iba1 molecules in the central nervous system of mice in response to

neurovirulent influenza A virus infection. *Microbiol. Immunol.* 2000, 44, 729–735

Mosser DM, and Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8,958–969

Mukhopadhyay S, Das S, Williams EA, Moore D, Jones JD, Zahm DS et al. Lypopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB2 cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J Neuroimmunol.* 2006, 181: 82–92

Muñoz-Torrero. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 2008, pp. 2433-2445

Neubrand VE, Pedreno M, Caro M, Forte-Lago I, Delgado M and Gonzalez-Rey E. Mesenchymal Stem Cells Induce the Ramification of Microglia Via the Small Rho GTPases Cdc42 and Rac1. *Glia.* 2014, 62:1932–1942

Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem.* 2004, 88(4):844-56

Ohsawa K., Imai Y., Kanazawa H., Sasaki Y. and Kohsaka S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell Sci.* 2000, 113, 3073–3084

Onaivi ES. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*. 2006, 54(4):231-46

Pazos MR, Nunez E, Benito C, Tolon RM, Romero J. Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci*. 2004, 75: 1907–1915

Perry G, Cash AD, Smith MA. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J. Biomed. Biotechnol*. 2002, 2 :120-123

Piomelli D., Tarzia G., Duranti A., Tontini A. and Mor M., Compton T. R., Dasse O, Monaghan E. P., Parrott J. A., Putman D. Pharmacological Profile of the Selective FAAH Inhibitor KDS-4103 (URB597). *J. CNS Drug Reviews*. 2006, 12: 21-38

Pixley FJ. Macrophage migration and its regulation by CSF-1. *Int J CellBiol*. 2012, 501962

Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci*. 2005, 25:1904–1913

Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci*. 2005, 25:1904–1913

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back”. *Science*. 2003, 5, 302 (5651): 1704-1709

Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell*. 2011, 145

Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell*. 2011, 145:1012–1022

Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trend Cell Biol*. 2006, 16: 522-529

Ridley AJ. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *Journal of Microscopy*. 2013, 251 (3): 242-249

Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, et al. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *GLIA*. 2002, 40: 260-269

Russo R, LoVerme J, La Rana G, Compton TR, Parrott J, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Calignano A, Piomelli D. The Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor URB597 (Cyclohexylcarbamic Acid 3'-Carbamoylbiphenyl-3-yl Ester) reduces neuropathic pain after oral administration in mice. *JPET*. 2007, 322: pp. 236–242

Saijo K and Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011, 11, 775–787

Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S and Imai Y. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 286, 292–297

Schmitz AA, Govek EE, Böttner B, Van Aelst L. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion”. *Exp Cell Res.* 2000, 261(1): 1-12

Shao-Hua Su, Yue-Qing Wang, Yi-Fang Wu, Da-Peng Wang, Qi Lin, Jian Hai. Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 may protect against cognitive impairment in rats of chronic cerebral hypoperfusion via PI3K/AKT signaling. *Behavioural Brain Research.* 2016, 313, 334–344

Sharir H, Console-Bram L, Mundy C, Popoff SN, Kapur A, and Abood ME. The endocannabinoids anandamide and virodhamine modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55. *J. Neuroimm. Pharma.* 2012, 7(4): 856–865

Shubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G. The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron.* 1989, 3(6):689-94

Sisodia S, Koo E, Beyreuther, Price D. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science.* 1990, Vol. 248 no. 4954 pp. 492-495

Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol.* 2006, 1:151–170

Smith SD, Jaffer ZM, Chernoff J, Ridley AJ. PAK1-mediated activation of ERK1/2 regulates lamellipodial dynamics. *J Cell Sci.* 2008, 121:3729–3736

Song S, Zhou F, Chen WR. Low-level laser therapy regulates microglial function through Src-mediated signaling pathways: Implications for neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation.* 2012, 9:219

Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope. *Pharmacol Res.* 2005, 51: 1–17)

Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol.* 2008, 65:184–189

Soulet D, and Rivest S. Microglia. *Curr Biol.* 2008, 18, R506–R508

Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astocytes, and astrocytomas. *Glia.* 2010, 58: 1017-1030

Su SH, Wu YF, Lin Q, Hai J. Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 ameliorate neuroinflammatory responses in chronic cerebral

hypoperfusion model by blocking NF- κ B pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017, 390(12):1189-1200

Tanaka M, Yagyu K, Sackett S, Zhang Y. Anti-Inflammatory Effects by Pharmacological Inhibition or Knockdown of Fatty Acid Amide Hydrolase in BV2 Microglial Cells. *Cells.* 2019, 8(5)

Tarassishin L, Suh HS, Lee SC. Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *JNeuroinflammation.* 2011, 8:187

Tham CS, Whitaker J, Luo L, Webb M. Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett.* 2007, 581(16):2899-904

Thinakaran G, koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol chem.* 2008, 283(44):29615-9

Tokizane K, Konishi H, Makide K, Kawana H, Nakamuta S, Kaibuchi K, Ohwada T, Aoki J, Kiyama H. Phospholipid localization implies microglial morphology and function via Cdc42 in vitro, *Glia.* 2017, 65(5):740-755

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1998, 83(2):393-411

Vazquez C, et al. Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation. *Neurobiol. Aging*. 2015, 36, 3008-3019

Walsh DM, Selkoe DJ. Ab oligomers: a decade of discovery. *J Neurochem*. 2007, 101: 1172– 1184

Yankner BA. New clues to Alzheimer's disease: Unraveling the roles of amyloid and tau. *Nature medicine*. 1996, 2: 850-852

Young-Jung Lee, Sang Bae Han, Sang-Yoon Nam, Ki-Wan Oh, and Jin Tae Hong. Inflammation and Alzheimer's Disease. *Arch. Pharm. Res.* 2010, 33 (10): 1539-1556

Zhiyou Cai, M. Delwar Hussain and Liang-Jun Yan. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci.* 2014, 124:5, 307-321

