



**UNIVERSITA' DI PISA**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

*Tesi di Laurea Specialistica*

*RUOLO DI SUSCETTIBILITA' GENETICA  
DEGLI APLOGRUPPI MITOCONDRIALI  
NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER*

**Candidato: Giulia RICCI**

**Relatore: Chiar.mo Prof. Gabriele SICILIANO**

Anno Accademico 2005/2006

## INDICE

<b>1</b>	<b>RIASSUNTO DELLA TESI .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>6</b>
2.1	<b>Definizione e dati epidemiologici .....</b>	<b>6</b>
2.2	<b>Quadro clinico e criteri diagnostici .....</b>	<b>10</b>
2.3	<b>Neuropatologia .....</b>	<b>15</b>
2.4	<b>Eziopatogenesi .....</b>	<b>18</b>
2.4.1	<i>Patogenesi delle forme familiari autosomico-dominanti ad esordio precoce .....</i>	<i>19</i>
2.4.2	<i>Ruolo di fattore di suscettibilità genetica dell'ApoE nelle forme sporadiche.....</i>	<i>22</i>
2.4.3	<i>Ipotesi della cascata dell'amiloide .....</i>	<i>24</i>
2.4.4	<i>Stress ossidativo e malattia di Alzheimer.....</i>	<i>26</i>
2.4.5	<i>I mitocondri: la sede di produzione dell'energia aerobica della cellula .....</i>	<i>36</i>
2.4.6	<i>Disfunzione mitocondriale nel processo dell'invecchiamento.....</i>	<i>43</i>
2.4.7	<i>Disfunzione mitocondriale e malattia di Alzheimer.....</i>	<i>44</i>
2.4.8	<i>Il ruolo del mitocondrio nell' apoptosi .....</i>	<i>48</i>
2.4.9	<i>Ruolo patogeno di mutazioni del mtDNA nella malattia di Alzheimer.....</i>	<i>54</i>
2.5	<b>Gli aplogruppi mitocondriali .....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>61</b>
4.1	<b>Selezione dei soggetti reclutati nello studio .....</b>	<b>61</b>
4.2	<b>Descrizione dei metodi utilizzati per l'analisi degli aplogruppi mitocondriali.....</b>	<b>62</b>
4.2.1	<i>Estrazione del DNA .....</i>	<i>62</i>
4.2.2	<i>Reazione a catena della polimerasi (Polymerase chain reaction, PCR) .....</i>	<i>63</i>
4.2.3	<i>Digestione dei segmenti amplificati del mtDNA con la tecnica RFLP .....</i>	<i>64</i>
4.3	<b>Tipizzazione del genotipo dell'ApoE .....</b>	<b>65</b>
4.4	<b>Analisi statistica.....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>RISULTATI .....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>TABELLE E FIGURE .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>93</b>

## **1 RIASSUNTO DELLA TESI**

La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa che costituisce da sola circa due terzi di tutte le forme di demenza.

In una piccola percentuale dei casi la malattia mostra una trasmissione autosomica-dominante e vede coinvolte mutazioni causative a carico di tre geni implicati nel metabolismo della beta-amiloide. Nella maggioranza dei casi la malattia ha invece carattere sporadico e mostra una patogenesi eterogenea e multifattoriale, in gran parte sconosciuta.

Lo stress ossidativo è stato chiamato in causa come importante fattore implicato nella patogenesi della malattia in base all'osservazione che, accanto ai tipici reperti anatomopatologici, si ha evidenza di danno mediato da specie reattive dell'ossigeno, non soltanto a livello del sistema nervoso centrale ma anche a livello periferico. Il mitocondrio rappresenta la sede primaria della produzione energetica e la principale sorgente di radicali liberi; esso svolge inoltre un ruolo di primo piano nel mantenere l'omeostasi del calcio e nell'innescare la cascata di segnali che portano la cellula alla apoptosi. Per questo motivo l'attenzione della ricerca negli ultimi anni è stata finalizzata ad individuare un eventuale coinvolgimento dei mitocondri nei processi

che sottendono la neurodegenerazione. Mutazioni a carico del DNA mitocondriale potrebbero infatti ridurre l'efficienza dei meccanismi di produzione energetica attraverso la fosforilazione ossidativa e allo stesso tempo incrementare la produzione di specie reattive dell'ossigeno.

È stato quindi ipotizzato che alcuni polimorfismi del genoma mitocondriale, che definiscono uno specifico aplogruppo, possano rendere un'individuo più suscettibile a tale danno ed innescare più precocemente il meccanismo apoptotico; all'opposto altri polimorfismi potrebbero migliorare l'attività della fosforilazione ossidativa e/o ridurre la produzione di radicali liberi.

Partendo da tali premesse, lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare un possibile ruolo di suscettibilità genetica degli aplogruppi mitocondriali nella malattia di Alzheimer. È stata analizzata la frequenza degli aplogruppi mitocondriali in 210 pazienti con diagnosi di malattia di Alzheimer probabile e confrontata con i dati genetici ottenuti da una popolazione di controllo omogenea, costituita da 191 soggetti. Sia il gruppo dei pazienti che il gruppo dei controlli è stato estratto dalla popolazione della regione Toscana. La frequenza degli aplogruppi non ha mostrato alcuna differenza tra i pazienti e i controlli; inoltre nel gruppo dei pazienti non è stata riscontrata alcuna

associazione tra aplogruppi, sesso e genotipo dell'ApoE, quale principale fattore di suscettibilità ad oggi riconosciuto della malattia di Alzheimer.

I suddetti dati sembrano quindi escludere un ruolo di suscettibilità genetica degli aplogruppi mitocondriali nella malattia di Alzheimer.

## **2 INTRODUZIONE**

### **2.1 Definizione e dati epidemiologici**

La demenza è un disturbo delle funzioni intellettive, acquisito o di natura organica, caratterizzato da una progressiva compromissione della memoria a breve e a lungo termine e di almeno una delle attività mentali primarie, cioè il pensiero astratto, la capacità critica, il linguaggio, l'orientamento topografico, in assenza di alterazioni della coscienza e con significativa interferenza nella attività lavorativa e nelle relazioni interpersonali (Manuale diagnostico dei disturbi Mentali-DSM IV, 1994).

Indagini epidemiologiche hanno rilevato che circa il 4-5% dei soggetti al di sopra dei 65 anni è affetto da demenza, e tale percentuale cresce proporzionalmente con l'età, arrivando ad interessare più del 30% degli ultraottantenni. Il numero dei casi è destinato inevitabilmente a crescere per il progressivo invecchiamento della popolazione, dal momento che studi prospettici parlano di un aumento del numero degli anziani nei paesi occidentali pari al 250% entro il 2030. Circa il 50-55% dei pazienti dementi risulta essere affetto da malattia di Alzheimer, il 15% da demenza vascolare e un altro 15-20% da forme miste, in cui coesistono alterazioni tipo Alzheimer e infarti

multipli. I restanti casi, pari al 10-15%, sono da ascrivere a demenza di varia natura: degenerativa, carenziale, metabolica, endocrina, tossica, infettiva, traumatica, tumorale, da idrocefalo normoteso (Tab.1) (Loeb e Favale, 2003).

La malattia di Alzheimer è la più comune patologia neurodegenerativa, che costituisce da sola circa due terzi di tutte le forme di demenza (Robert et al., 2003). Nel 1907 in Germania, a Monaco di Baviera, il professore Alois Alzheimer descriveva il primo caso della malattia che riceverà il suo nome: si tratta di una donna di anni 51, vista per la prima volta nel 1901 a Francoforte e della quale, dopo la morte avvenuta nel 1906, descrive le peculiari alterazioni anatomopatologiche cerebrali. Nell'articolo pubblicato su *Neurologisches Zentralblatt* (dal titolo "Su un singolare processo patologico della corteccia cerebrale") Alzheimer riportava che "il primo sintomo che la paziente aveva manifestato era stata una intensa gelosia verso il marito [...], molto presto associato a un rapido deterioramento della memoria per cui non poteva ritrovare la via di casa". Negli stessi anni un neurologo italiano, Gaetano Perusini, stretto collaboratore di Alzheimer, completava la dettagliata descrizione delle tipiche lesioni cerebrali, citando altri tre casi (Pepeu, 2004). Per lungo tempo la malattia di Alzheimer fu considerata una

rara demenza pre-senile; solo negli anni '70 una serie di studi dimostrarono che la demenza pre-senile di Alzheimer e la demenza senile avevano la medesima sintomatologia e il medesimo substrato anatomopatologico, per cui attualmente si ritiene che esista un'unica entità nosologica, denominata "demenza tipo Alzheimer" (Loeb e Favale, 2003).

Le misure di prevalenza della malattia di Alzheimer possono variare in funzione dei criteri diagnostici utilizzati, dell'età della popolazione osservata e di altri fattori, inclusi fattori etnici, geografici, socioculturali (Hy e Keller, 2000; Hendrie et al., 2001). Approssimativamente la prevalenza della malattia si attesta intorno all'1% tra i 65 e i 69 anni, ed aumenta progressivamente con l'età fino a raggiungere valori pari al 40- 50% nei soggetti al di sopra dei 95 anni.(Robert et al., 2003). Da recenti studi è emerso che in Italia attualmente ne sono affette oltre 500.000 persone e si prevede che il loro numero raddoppi nell'arco dei prossimi vent'anni. L'età media di insorgenza è intorno agli 80 anni, anche se esistono rare forme ad esordio precoce, così definite quando la sintomatologia compare prima dei 65 anni (6-7% di tutti i casi di malattia di Alzheimer) (Campion et al., 1999).

La malattia colpisce entrambi i sessi, con predilezione per le donne, indipendentemente dalla loro maggiore durata di vita (Cutter et al., 2003; Sherwin, 2003; Lambert et al., 2004).

Il principale fattore di rischio è l'età, seguito dalla familiarità, che si presenta in due diverse forme: solo in una piccola minoranza, valutabile intorno all'1-2%, la malattia è trasmessa in modo dominante, a penetranza completa e tutte le generazioni risultano colpite da una forma ad esordio precoce (30-35 anni in casi estremi) ed aggressiva. Nel 50-60% dei casi esiste una familiarità debole che si esprime nella presenza di due individui affetti in generazioni diverse, suggerendo l'esistenza di polimorfismi genetici che predispongono alla malattia. (Van Duijn et al., 1991; Rocchi et al., 2003).

Altri fattori di rischio, che richiedono comunque una conferma, sono stati identificati nella bassa scolarità e in pregressi traumi cranici (Cernak et al. 2000; Loeb e Favale, 2003). Fattori ambientali quali l'alluminio (Forbes e Hill, 1998), il mercurio, virus e prioni sono stati proposti come possibili fattori di rischio, ma un loro eventuale ruolo causale non è stato dimostrato (Braunwald et al., 2001).

Il fumo non sembra svolgere un'azione protettiva nei confronti della malattia, né influente sull'età di insorgenza della stessa (Doll et al., 2000).

## **2.2 Quadro clinico e criteri diagnostici**

La malattia di Alzheimer è caratterizzata clinicamente da un deterioramento ingravescente delle capacità cognitive e dalla comparsa di disturbi comportamentali e dell'affettività che portano inesorabilmente il malato ad una perdita dell'autonomia funzionale ed all'impossibilità di mantenere rapporti congrui con l'ambiente circostante. L'esordio è solitamente subdolo ed insidioso, con deficit cognitivi e lievi alterazioni di personalità e comportamento che in un primo tempo possono essere attribuiti alle "normali" modificazioni che si determinano con l'età, per cui spesso a posteriori le prime manifestazioni di malattia vengono fatte risalire anche a tre-quattro anni prima.

La malattia è classicamente distinta in tre fasi, anche se la grande variabilità della comparsa dei sintomi non ne rende sempre possibile il riconoscimento.

La prima fase è caratterizzata dalla comparsa di deficit mnestici a breve termine, con perfetta conservazione della memoria

autobiografica, associati a un calo degli interessi e indifferenza verso i problemi familiari. Possono manifestarsi le prime difficoltà nel risolvere alcuni compiti complessi o non usuali per il soggetto o verificarsi episodi di disorientamento spaziale in luoghi non familiari. In questa fase l'insight è sovente mantenuto: il paziente tende a mascherare i suoi deficit attraverso confabulazioni e minimizzando i propri errori; altre volte la consapevolezza si manifesta con stati d'ansia e deflessione del tono dell'umore o con irritabilità e scatti di rabbia. Per quanto riguarda il linguaggio, il paziente può presentare anomalie durante l'eloquio spontaneo, che però appaiono ancora entro la normalità, quantomeno ad un'osservazione superficiale. Compaiono i primi disturbi prassici, come difficoltà nell'usare appropriatamente strumenti di non uso quotidiano o nel disegnare figure tridimensionali.

Nella fase successiva i disturbi cognitivi cominciano ad essere di entità tale da rendere difficile al paziente una vita completamente autonoma. La memoria recente diviene gravemente compromessa e si fa sempre più evidente sia il disorientamento spaziale che temporale. I deficit del linguaggio progrediscono fino ad arrivare ad un eloquio povero di significato, con perdita della normale capacità di denominazione, difficoltà a trovare le parole e necessità di ricorrere a

circonlocuzioni; possono essere alterate anche la comprensione e la ripetizione, così come la scrittura e la lettura, fino all'agrafia e all'alessia. Precoce è la comparsa dell'aprassia sia ideo-motoria che costruttiva, con conseguente incapacità di eseguire anche semplici sequenze motorie come vestirsi e mangiare.

La modificazione della personalità si rende in questo stadio molto evidente, con una marcata riduzione dell'attenzione, della capacità critica di giudizio e della partecipazione agli avvenimenti. Possono comparire e progredire di pari passo turbe del comportamento, soprattutto disinibizione, irascibilità, aggressività, facilità al pianto, talora deliri, allucinazioni e sintomi di tipo ossessivo-compulsivo. Spesso si associa anche un'alterazione del ritmo sonno-veglia.

L'esame obiettivo evidenzia ipertonìa muscolare generalizzata associata a rallentamento e stereotipia dei movimenti ed è possibile il riscontro di riflessi primitivi (suzione, prensione palmare e plantare, riflesso plantare estensorio), che si rendono comunque più evidenti negli stadi terminali.

Nella terza fase il paziente diventa completamente dipendente nel lavarsi, vestirsi, mangiare ed andare in bagno, non più in grado di soddisfare i propri bisogni personali in modo opportuno e in sedi adeguate. La memoria, anche remota, è profondamente deteriorata,

con incapacità di riconoscere oggetti e familiari, giungendo perfino a dimenticare il luogo e la data di nascita. Il linguaggio diventa molto ridotto nella sua produzione, scompare l'eloquio spontaneo, è frequente l'insorgenza di ecolalia, palilalia, logoclonia.

Il paziente può assumere un atteggiamento di "affaccendamento inoperoso" con apparente ed impropria attività, oppure un comportamento apatico ed indifferente ad ogni sollecitazione.

Si fa sempre più marcata la rigidità muscolare che rende difficile la deambulazione ("strascicata") e l'esecuzione di movimenti finalizzati.

La fase terminale culmina con un quadro di tetraparesi in flessione e cachessia complicata da immunodepressione e fenomeni infettivi, frequentemente broncopolmonari, che portano in genere all'exitus in pochi mesi.

La durata della malattia è in media di circa otto-dieci anni, potendo variare da uno a venticinque anni (Mecocci et al., 2001, Braunwald et al., 2001; Loeb e Favale, 2003).

La diagnosi di malattia di Alzheimer rappresenta la tappa finale di un percorso che parte da un'attenta raccolta dei dati anamnestici e passa attraverso l'esecuzione di una serie di accertamenti clinico-laboratoristici finalizzati a determinare un livello probabilistico di conferma.

Una valutazione neuropsicologica completa, che prenda in esame i diversi aspetti della cognitiv ,   di importanza fondamentale per valutare il tipo e l'entit  dei deficit e per fornire un primo orientamento diagnostico, oltre che a definire il piano terapeutico e a misurarne l'efficacia nel tempo. (Blessed et al., 1968 ; Folstein et al., 1975; Pfeiffert et al., 1975; Bracco et al., 1990; Brazzelli et al., 1994).

L'uso di indagini ematochimiche e strumentali migliora l'accuratezza diagnostica, anche se attualmente non esistono markers biologici di malattia di Alzheimer, e permette di escludere altre cause di demenza; in particolare un esame di neuroimmagine (TC, RM e in casi selezionati SPECT e PET)   considerato fondamentale nel protocollo diagnostico delle demenze (Petersen et al., 2000; Knopman et al., 2001; Wang et al., 2004).

Attualmente la diagnosi di malattia di Alzheimer, non potendo comunque contare sulla conferma di dati di laboratorio e strumentali, si affida all'applicazione in ambito clinico di protocolli standardizzati, accettati a livello internazionale, fondati sull'esclusione di altre cause di demenza. I criteri clinici pi  utilizzati e precisi per la definizione di malattia di Alzheimer sono quelli del NINCDS-ADRDA *Work Group* (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Sroke; Alzheimer's Disease and Related Disorders Association Work*

*Group*) (McKhann et al., 1984), che delineano tre differenti livelli di accuratezza diagnostica (Tab. 2).

Rimane sempre però un certo grado di incertezza diagnostica, essendo allo stato attuale accettato come criterio di diagnosi definitiva l'esame istologico, ovviamente non disponibile in vita.

### **2.3 Neuropatologia**

Da un punto di vista macroscopico la caratteristica più evidente del cervello di un soggetto con malattia di Alzheimer è la marcata atrofia che determina un'aumentata ampiezza dei solchi cerebrali e l'incremento del volume ventricolare. Anche nell'invecchiamento fisiologico è presente atrofia cerebrale, ma di grado più lieve e con principale coinvolgimento del lobo temporale, mentre nella demenza di Alzheimer essa appare più diffusa, interessando, oltre al lobo temporale, le aree associative corticali, l'ippocampo ed il giro para-ippocampale, con relativo risparmio delle aree posteriori degli emisferi, del cervelletto e del tronco cerebrale. L'atrofia è legata principalmente alla degenerazione neuronale, che comporta riduzione del numero delle spine dendritiche e delle giunzioni sinaptiche, fino ad una vera e propria scomparsa della cellula nervosa per meccanismo apoptotico. Fra le strutture sottocorticali, particolarmente colpite dalla

degenerazione sono l'amigdala, il locus coeruleus, il nucleo del rafe e le strutture colinergiche del tronco cerebrale (nucleo basale di Meynert, nucleo del setto mediale, nucleo della banda diagonale di Broca).

Da un punto di vista microscopico, le alterazioni istologiche caratteristiche, anche se non patognomiche, sono le placche senili, l'angiopatia amiloide e i grovigli neurofibrillari.

Le **placche senili** sono strutture a localizzazione extracellulare, di forma rotondeggiante od ovale, di diametro di 50-200  $\mu\text{m}$ , messe in evidenza con l'impregnazione argentea e formate da una parte centrale proteica di amiloide circondata da un'area di neuriti distrofiche e cellule reattive gliali. La sostanza amiloide è costituita da fibrille di 6-10 nm di diametro, composte da un peptide di 40-43 aminoacidi, denominato  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), che origina per idrolisi enzimatica da una molecola di più grandi dimensioni, la proteina precursore della amiloide (*amyloid precursor protein*, APP).

L'**angiopatia amiloide** coinvolge le strutture vascolari delle leptomeningi e della corteccia e si caratterizza per l'accumulo di materiale fibrillare formato dalla proteina amiloide a livello dell'avventizia e della media.

I **grovigli neurofibrillari** sono costituiti da ammassi di filamenti argentofili localizzati nel citoplasma perinucleare e spesso fino a livello dei dendriti apicali, di forma globosa o a fiamma. Queste tipiche lesioni sono diffuse e interessano sia gli strati superficiali che profondi della corteccia associativa, i neuroni dei gangli della base e di alcuni nuclei del tronco encefalico. Al microscopio elettronico essi appaiono formati da una coppia di filamenti avvolti ad elica del diametro di 10 nm e costituiti dalla proteina tau iperfosforilata. La proteina tau è una glicoproteina associata ai microtubuli: la sua abnorme fosforilazione è essenziale nel determinarne il collasso e l'aggregazione nei grovigli neurofibrillari, i quali a loro volta determinano un'alterazione morfologica del citoscheletro che funzionalmente si traduce in un'alterata compartimentalizzazione delle strutture intracitoplasmatiche ed in un disturbo del normale flusso assoplasmatico, fino alla morte neuronale.

Dal punto di vista biochimico la malattia di Alzheimer è associata ad una riduzione dei livelli di varie proteine e neurotrasmettitori, in particolare dell'acetilcolina. La riduzione dell'acetilcolina potrebbe essere correlata alla degenerazione dei neuroni colinergici del nucleo basale di Meynert, che proiettano a numerose aree della corteccia. Si rileva inoltre una riduzione dei livelli di noradrenalina nei nuclei del

tronco e a livello del locus coeruleus. (Cotran et al., 2000; Braunwald et al., 2001).

## **2.4 Eziopatogenesi**

In base all'età di esordio della malattia, distinguiamo due forme: malattia ad esordio precoce (*early-onset*), quando la sintomatologia compare prima dei 65 anni, e malattia ad esordio tardivo (*late-onset*) dopo i 65 anni (Nussbaum et al., 2003).

Le forme ad esordio precoce costituiscono il 6-7% di tutti i casi di malattia di Alzheimer e circa il 7% delle forme *early-onset* mostrano un'ereditarietà di tipo autosomico dominante a penetranza completa (Campion et al., 1999).

Nella stragrande maggioranza dei casi la malattia di Alzheimer ha carattere sporadico, esordio tardivo e mostra perciò una patogenesi multifattoriale, dove concorrono fattori sia di ordine genetico che ambientale e dalla cui interazione si innescano meccanismi di amplificazione del danno iniziale, con conseguente perdita funzionale e strutturale progressiva delle cellule nervose. La ricerca ha messo in luce di volta in volta diversi aspetti patogenetici, chiamando in causa fattori genetici, infiammatori, ormonali, stress ossidativo, che sembrano costituire i vari tasselli di un complesso quadro unitario, ma

rimane da comprendere il *primum movens* e la loro esatta sequenza nell'insorgenza della malattia.

#### 2.4.1 Patogenesi delle forme familiari autosomico-dominanti ad esordio precoce

Sono state identificate nel corso degli anni una serie di mutazioni responsabili delle forme familiari ad esordio precoce a carico di tre geni, quali il gene del precursore proteico dell'amiloide (*amyloid precursor protein*, APP), che mappa sul cromosoma 21 (Tanzi et al., 1987; Goate et al. 1991), e i geni delle preseniline 1 e 2 (*PSEN1* e *PSEN2*), che mappano rispettivamente sul cromosoma 14 e sul cromosoma 1 (Mullan et al., 1992; Schelleberg et al., 1992, St.George-Hyslop, 1992; Sherington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995).

L'APP è una glicoproteina di membrana, con un lungo segmento extracellulare N-terminale ed un breve segmento intracellulare C-terminale (Kang et al., 1987), da cui origina per idrolisi enzimatica, attraverso una serie di proteasi, il peptide A $\beta$ , presente nel nucleo centrale delle placche senili e nella parete dei vasi cerebrali colpiti da amiloidosi. La glicoproteina può essere catabolizzata attraverso due diverse vie enzimatiche. La via non amiloidogenica coinvolge

l'enzima associato alla membrana  $\alpha$ -secretasi e porta alla formazione di un frammento solubile N-terminale (Selkoe, 1994). L'altra via si realizza nel compartimento lisosomiale ad opera della  $\beta$ -secretasi (che produce la porzione N-terminale dell'A $\beta$ ) e della  $\gamma$ -secretasi (che libera la porzione C-terminale), la cui azione combinata o sequenziale determina il rilascio del peptide A $\beta$  nel mezzo extracellulare. Il sito di taglio della  $\gamma$ -secretasi è di primaria importanza per la formazione di peptidi di differente lunghezza: il peptide A $\beta$  di 39 o 40 aminoacidi è la forma più comune, prodotta attraverso il clivaggio dei residui 712-713 e non è amiloidogenico. Il peptide di 42 o 43 aminoacidi (A $\beta$ 42-43), generato dal clivaggio dopo il residuo aminoacidico 714, è invece più neurotossico, in quanto capace di formare fibrille insolubili e di accumularsi nelle placche senili (Koo et al., 1994).

Ad oggi sono state identificate ben quindici mutazioni missense a livello del gene sul cromosoma 21 (Rocchi et al., 2003) e si ipotizza che esse siano responsabili di un alterato metabolismo dell'APP e spostino il sito di clivaggio a favore della  $\gamma$ -secretasi, determinando in tal modo un'incrementata produzione di peptidi A $\beta$  amiloidogenici (Nilsberth et al., 2001; Beck et al., 2003). Tali mutazioni risultano

però coinvolte solo in un 10% circa delle forme ereditarie ad esordio precoce (Bertram e Tanzi, 2004).

Gli altri due geni (*PSENI* e *PSEN2*) identificati come responsabili delle forme familiari di malattia di Alzheimer codificano per due proteine transmembrana dotate di un'altissima omologia, chiamate presenilina 1 e presenilina 2 (PS1, PS2), localizzate principalmente a livello del reticolo endoplasmatico, dell'apparato di Golgi e della membrana nucleare (Kovacs et al., 1996). Sebbene il preciso meccanismo d'azione nella patogenesi della malattia non sia noto, la localizzazione di entrambe le proteine nelle membrane intracellulari supporta l'idea di un possibile ruolo nella processazione dell'APP e che una loro mutazione comporti una maggiore produzione di frammenti lunghi di  $\beta$ -amiloide. Attualmente si conoscono circa 130 mutazioni causative a carico di *PSNE1*, responsabili di oltre il 50% delle demenze familiari, e 9 mutazioni a carico di *PSEN2*, che risultano invece coinvolte solo in una piccola frazione di pazienti (Bertram e Tanzi, 2004).

Malgrado le fondamentali conquiste nella comprensione della genetica e della fisiopatologia della malattia di Alzheimer familiare ad esordio precoce, sicuramente quindi rimangono ancora da identificare addizionali fattori genetici, visto e considerando che numerosi pazienti

(circa il 40%) non presentano alcuna mutazione a carico dei tre geni sopradescritti.

#### 2.4.2 Ruolo di fattore di suscettibilità genetica dell'ApoE nelle forme sporadiche

Più complesso è l'inquadramento delle forme sporadiche ad esordio tardivo; si tratta spesso di casi isolati, o dotati di debole familiarità, alla cui insorgenza si suppone concorrano elementi sia di ordine genetico che ambientale.

Moltissimi geni sono stati studiati e ritenuti implicati nel complesso meccanismo patogenetico, ma probabilmente agiscono solo come fattori predisponenti, privi della forza di indurre essi stessi la malattia (Rocchi et al., 2003): tra questi il gene dell'apolipoproteina E è stato individuato come il principale fattore di suscettibilità .

L'apolipoproteina E (ApoE) è una glicoproteina plasmatica sintetizzata principalmente dal fegato, dai neuroni e dagli astrociti, ma anche da altri tipi di cellule, inclusi macrofagi e monociti (Siest et al., 1995); è presente nei chilomicroni, nelle VLDL e nelle HDL ed è coinvolta nella mobilizzazione e nella redistribuzione del colesterolo a livello del sistema nervoso centrale. Svolge inoltre molte altre funzioni, risultando coinvolta nei meccanismi di rigenerazione dei

nervi, nella immunoregolazione e nell'attivazione di una serie di enzimi lipolitici (Mahely et al., 2000; Vance et al., 2000).

Della proteina si conoscono tre maggiori isoforme, denominate ApoE2, ApoE3 e ApoE4 (Uterman et al., 1979, Zannis et al., 1981) e codificate da tre alleli diversi ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ) di uno stesso gene presente sul braccio lungo del cromosoma 19. La frequenza degli alleli  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  e  $\epsilon 4$  nella popolazione è rispettivamente pari all'10%, al 75% e al 15% (Saunders et al., 1993); inoltre l'allele  $\epsilon 4$  è risulta più comune nel sesso femminile (Corbo e Scacchi, 1999).

Numerosi studi hanno identificato l'ApoE come il principale fattore di suscettibilità delle forme sporadiche ad esordio tardivo della malattia di Alzheimer e in particolare è stato dimostrato che i soggetti portatori dell'allele  $\epsilon 4$  hanno un rischio aumentato di sviluppare la demenza. Sebbene l'associazione tra ApoE4 e Alzheimer sia robusta, non è specifica: infatti, a differenza delle varianti genetiche delle forme familiari ad esordio precoce, la presenza dell'allele  $\epsilon 4$  non è una condizione né necessaria né sufficiente per causare la malattia (Bertram e Tanzi, 2004). Essa agisce soprattutto anticipando l'esordio della sintomatologia in modo dose-dipendente, dal momento che gli omozigoti mostrano una più precoce età di insorgenza rispetto agli eterozigoti. In termini statistici l'effetto si traduce in un aumento del

rischio di circa tre volte negli eterozigoti e di circa 15 volte negli omozigoti, se comparati con i soggetti portatori del genotipo  $\epsilon 3$  (Nussbaum e Ellis, 2003).

#### 2.4.3 Ipotesi della cascata dell'amiloide

Il riscontro dei tipici reperti anatomopatologici a livello del sistema nervoso centrale, l'identificazione dei geni mutati nelle forme familiari e l'evidenza di un coinvolgimento dell'ApoE, quale principale fattore di suscettibilità delle forme sporadiche, nel metabolismo del peptide  $A\beta$  hanno portato alla formulazione di un'ipotesi patogenetica unificante, che vede nell'accumulo della  $\beta$ -amiloide e nella sua strutturazione in placche insolubili l'evento primario nella genesi della demenza di Alzheimer: si tratta della cosiddetta "*ipotesi della cascata della amiloide*" (Selkoe, 2000). Secondo tale teoria, per effetto di un'aumentata produzione o di un diminuito smaltimento, la concentrazione del peptide  $\beta$ -42 aumenterebbe progressivamente fino a raggiungere un livello critico di polimerizzazione tale da innescare uno stato di stress ossidativo ed indurre una degenerazione associata ad alterazioni del citoscheletro (grovigli neurofibrillari) e a morte cellulare programmata. Tutti gli altri fattori coinvolti giocherebbero quindi un ruolo secondario nel

determinismo della malattia, mediante un'azione facilitante il deposito del peptide fibrillare. I meccanismi attraverso i quali la  $\beta$ -amiloide esplica il suo effetto neurotossico non sono ancora completamente chiariti: sembra che la forma fibrillare insolubile, interagendo con la membrana neuronale, determini un'alterazione dei processi di trasduzione del segnale e porti la cellula all'apoptosi. L'innescò di tali meccanismi potrebbe essere facilitato dalla produzione di radicali liberi, di citochine infiammatorie per attivazione delle cellule microgliali e dall'aumentata sensibilità agli aminoacidi eccitatori. I danni alla membrana neuronale potrebbero poi contribuire ad una disregolazione nei meccanismi che controllano il flusso intraneuronale di calcio, con conseguente iperattivazione delle chinasi intracellulari ed iperfosforilazione della proteina tau.

Se questa ipotesi, che indica nell'accumulo della  $\beta$ -amiloide il primo ed unico fattore patogenetico, è ben applicabile nelle forme familiari in cui è possibile riscontrare mutazioni causative di malattia in geni direttamente coinvolti nel metabolismo dell'APP, non si può dire altrettanto per la maggioranza dei casi sporadici di demenza di Alzheimer, dove non esistono evidenze così forti da giustificare una primaria alterazione nella produzione del peptide  $\beta$ -42.

Nel corso degli anni sono state postulate ipotesi alternative, che chiamano in causa fattori in gran parte legati al fisiologico processo dell'invecchiamento, capaci di accelerare la degenerazione e la morte neuronale e contemporaneamente di modificare il metabolismo dell'APP, favorendo la produzione di  $\beta$ -amiloide. La malattia sarebbe quindi il risultato dell'interazione di svariati elementi, in primis dello stress ossidativo (Joseph et al., 2001), e la deposizione dell'amiloide diventerebbe in quest'ottica un fattore necessario ma non più sufficiente allo sviluppo della demenza di Alzheimer.

#### 2.4.4 Stress ossidativo e malattia di Alzheimer

Il ruolo cruciale mostrato dall'età quale principale fattore di rischio della malattia di Alzheimer, così come di altre patologie neurodegenerative, ha suggerito la possibile continuità tra i meccanismi molecolari e cellulari implicati nei "normali" processi dell'invecchiamento. Nel 1956 Denham Harman formula la cosiddetta "*teoria dei radicali liberi*", successivamente affinata da Miquel e collaboratori in quella che viene definita "*mitochondrial-free-radical hypothesis*" (1980), secondo la quale alla base del fisiologico invecchiamento cellulare e tissutale vi sarebbe il progressivo accumulo di alterazioni irreversibili indotte da radicali

liberi dell'ossigeno (*reactive oxygen species*-ROS) (Harman, 1992). Questi agenti ossidanti sono prodotti durante il normale metabolismo cellulare, in particolar modo a livello mitocondriale, e possono avere effetti positivi nei processi fisiologici dell'organismo, ad esempio nella risposta immunitaria; tuttavia esercitano anche effetti negativi in quanto derivati chimici estremamente reattivi capaci di modificare la struttura delle molecole con cui reagiscono e di danneggiare componenti chiave della cellula, quali la membrana lipidica, gli acidi nucleici, i carboidrati e le proteine, con conseguenti gravi disturbi nelle funzioni cellulari ed organiche (Polidori, 2003). La cellula possiede sistemi antiossidanti in grado di contrastare la produzione o gli effetti degli ossidanti stessi: quando questo equilibrio viene meno, si realizza quello che viene definito “*stress ossidativo*” (Praticò e Delanty, 2000), nei confronti del quale la vulnerabilità tende ad aumentare con l'avanzare dell'età.

Studi successivi hanno dimostrato infatti che il livello di produzione dei radicali liberi nei mitocondri subisce un incremento durante il processo dell'invecchiamento (Bandy e Davison, 1990; Sohal e Sohal, 1991) e che i danni ossidativi si accrescono in relazione con l'età, anche a seguito del graduale decremento delle capacità difensive della cellula (Agarwal e Sohal, 1995).

I radicali liberi sono specie chimiche caratterizzate dalla presenza di uno o più elettroni spaiati a livello dell'orbitale esterno, che conferiscono loro un'elevata instabilità (Halliwell, 1993). Da un punto di vista biologico molto importanti sono i ROS, generati principalmente come prodotti collaterali del trasporto elettronico nella catena respiratoria mitocondriale (Boveris et al., 1976; Turrens et al., 1985; Sohal e Sohal, 1991), estremamente reattivi, capaci di attaccare tutti i componenti della cellula, compresi il DNA mitocondriale e nucleare e le stesse proteine della catena respiratoria. Infatti una piccola frazione (circa 1-2%) dell'ossigeno consumato nei mitocondri non viene completamente ridotta ad H<sub>2</sub>O dalla catena di trasporto degli elettroni, ma subisce una riduzione parziale con conseguente formazione di radicali liberi.

I ROS generatisi vengono eliminati da enzimi *scavengers* ("spazzini") presenti nei mitocondri, quali la manganese-superoossido-dismutasi (Mn-SOD), la catalasi (che converte l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O) e la glutazione perossidasi (che catalizza la riconversione dei perossidi tramite il glutatione). In concomitanza con gli enzimi intervengono poi altri antiossidanti, come l'acido ascorbico (vitamina C), l' $\alpha$ -tocoferolo (vitamina E) e il  $\beta$ -carotene (Stahl e Sies, 1997). Nonostante le cellule dispongano quindi di vari sistemi di protezione, enzimatici e non, nei

confronti dei ROS e degli altri radicali liberi, una parte di questi può comunque sfuggire a tali meccanismi e causare danni transitori o permanenti ai componenti fondamentali per la sopravvivenza della cellula stessa.

Il DNA, sia nucleare che mitocondriale, interagisce soprattutto con il radicale idrossile (OH<sup>•</sup>) e con l'anione perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), che reagiscono facilmente con i siti ricchi di elettroni (Reiter et al., 1999).

I danni che ne derivano comprendono modificazione delle basi puriniche e pirimidiniche e rotture a singolo (SSBs, *single strand breaks*) o doppio (DSBs, *double strand breaks*) filamento.

L'alterazione delle basi puriniche si manifesta sottoforma di metilazione, deaminazione e soprattutto idrossilazione. Nelle condizioni di stress ossidativo, l'idrossilazione della guanina in posizione C8 è una delle modificazioni più frequenti a carico delle basi del DNA (8-idrossiguanina, 8-OH-dG) (Loft e Poulsen, 1996).

I radicali liberi reagiscono anche con i residui aminoacidici delle proteine: sono particolarmente suscettibili gli aminoacidi aromatici (triptofano, tirosina e fenilalanina), che contengono legami insaturi, e gli aminoacidi come la cisteina e la cistina, che possiedono legami disolfuro e gruppi sulfidrilici (Kleinveld et al., 1989). L'interazione tra radicali liberi e proteine porta alla formazione delle carbonilproteine e

della 3-nitrotirosina, quali utili indici di danno ossidativo a livello tissutale (Dean et al., 1997; Beal, 2002).

Le membrane cellulari sono un altro importante bersaglio dei ROS, primo fra tutti del radicale idrossile OH $\cdot$ . L'estrazione di un atomo di idrogeno dagli acidi grassi polinsaturi di membrana da parte dei radicali liberi genera un radicale lipidico (L $\cdot$ ) e un radicale idrogeno; a sua volta il radicale lipidico, reagendo con l'ossigeno, forma radicali lipoperossidi (LOO $\cdot$ ) in grado di strappare atomi di idrogeno a catene di acidi grassi adiacenti. In questo modo, dall'estrazione di una singola molecola di idrogeno si può innescare una reazione a catena che determina la conversione di molti lipidi di membrana in lipo-idroperossidi (L-O $_2$ H) (Halliwell e Chirico, 1993), la cui presenza compromette in maniera severa la funzionalità e la fluidità di membrana (Halliwell, 1993). I lipidi perossidati sono composti instabili che tendono a trasformarsi rapidamente in una serie di prodotti più stabili, quali le aldeidi (come il 4-idrossinonenale e la malondialdeide) (Esterbauer e Cheeseman, 1990), gli alcani o gli isoprostani (Cracowski et al., 2002).

Riassumendo quindi, in condizioni normali le specie reattive dell'ossigeno che si formano durante i processi metabolici della cellula comportano bassi livelli di danno, grazie alla presenza di

sistemi antiossidanti e alla rapida riparazione dei tratti alterati di DNA. Nel corso degli anni, condizioni di esposizione cronica ai radicali liberi sembrano poter spiegare i fisiologici cambiamenti che si osservano durante l'invecchiamento e si ipotizza che esse giochino un ruolo di primo piano anche nelle patologie neurodegenerative età-correlate, inclusa la demenza di Alzheimer (Chong et al., 2005). Il sistema nervoso centrale appare infatti particolarmente suscettibile ai danni dello stress ossidativo (Praticò e Delanty, 2000; Christen, 2000) per una serie di ragioni. In primo luogo appaiono implicati motivi di ordine biochimico, a partire dalla ricca composizione in acidi grassi polinsaturi, che rappresentano un substrato eccellente per la reazione da radicali liberi, dalla ricca riserva di ferro che catalizza questa reazione (Herbert et al., 1994), dall'alto turnover metabolico che soddisfa l'elevato bisogno di energia (il cervello consuma circa il 20% dell'ossigeno a disposizione dell'organismo), il tutto in condizioni di relativa carenza di attività antiossidante (Foy et al., 1999): è stato infatti visto ad esempio che l'attività dell'enzima catalasi è significativamente più bassa se comparata a quella presente in altri organi (l'attività catalasica cerebrale è circa il 10% di quella epatica). Sono poi implicati motivi di ordine anatomico, come la lunghezza degli assoni che facilita l'esposizione a danni chimicamente mediati e

la presenza di cellule neuronali perenni, ossia incapaci di entrare in mitosi e di sostituire eventuali elementi andati perduti per alterazioni irreversibili (Fukagawa, 1999).

Nel corso degli ultimi dieci anni l'ipotesi del coinvolgimento dello stress ossidativo nella patogenesi della demenza di Alzheimer è stata progressivamente avvalorata da un crescente numero di pubblicazioni (Praticò, 2005).

Molti di questi studi sono stati condotti a livello di tessuto cerebrale di pazienti deceduti affetti dalla malattia ed hanno reso possibile riscontrare, accanto ai tipici reperti anatomopatologici, un evidente accumulo di markers di danno ossidativo.

Il grado di perossidazione lipidica e di ossidazione proteica è risultato infatti significativamente aumentato in varie regioni cerebrali, con valori più elevati nella corteccia associativa frontale, parietale e temporale, nell'amigdala e nell'ippocampo (Esterbauer et al., 1991; Kristal et al., 1992; Hensley et al., 1995; Markesberry, 1997; Marcus et al., 1998). E' stato osservato inoltre un incremento del danno ossidativo a carico del DNA, quantificabile attraverso la misurazione della 8-idrossi-deossiguanosina (8-OH-dG): i suoi livelli non aumentano solo con l'avanzare dell'età, ma sono circa il doppio a

carico del DNA nucleare e il triplo a carico del DNA mitocondriale nei dementi rispetto ai controlli (Mecocci et al., 1994).

È ovvio che gli studi condotti post-mortem, sebbene documentino lo stato di stress ossidativo, non possono però aiutarci a comprendere se quest'ultimo rappresenti una manifestazione precoce nell'insorgenza della malattia o se viceversa debba essere considerato come un evento finale, comune ad ogni processo degenerativo.

Per tale motivo in questi ultimi anni la ricerca è stata finalizzata all'individuazione di un aumento del danno ossidativo in soggetti viventi con diagnosi clinica di demenza di Alzheimer (Praticò, 2005) e studi condotti su liquor (Lovell et al., 1997; Montine et al., 1999), ma anche su sangue (Waddington et al., 1999; McGrath et al., 2001; Conrad et al., 2000; Choi et al., 2002; Selley et al., 2002), urine (Tuppo et al., 2001) e tessuti periferici (fibroblasti, leucociti, eritrociti e piastrine) ne hanno confermato la presenza (Beal, 2005; Migliore et al., 2005a; Kawamoto et al., 2005), quasi a configurare la malattia di Alzheimer come un'affezione non limitata unicamente al sistema nervoso centrale, ma a carattere sistemico. E' stato osservato inoltre come l'incremento del danno ossidativo del DNA a livello periferico sia rilevabile non solo nei pazienti con quadro clinico conclamato, ma anche nei soggetti affetti da una forma iniziale di declino cognitivo,

definibile come *Mild Cognitive Impairment* (MCI) (Migliore et al., 2005b), quale fase precoce di malattia di Alzheimer scarsamente aggressiva (Loeb e Favale, 2003). Tale evidenza sembra quindi confermare l'ipotesi che lo stato di stress ossidativo rappresenti uno degli eventi più precoci nei processi fisiopatologici alla base della malattia (Nunomura et al., 2001; Smith et al., 2005).

L'importanza dello stress ossidativo nel meccanismo patogenetico è inoltre confermata dal fatto che tutti i fattori di rischio della malattia, inclusi l'età, il genotipo dell'ApoE e le mutazioni a carico dei geni del precursore dell'amiloide e delle preseniline 1 e 2, causano direttamente una perturbazione dell'omeostasi ossidoriduttiva cellulare.

L'ApoE sembra svolgere un'azione protettiva nei confronti dell'aggressione neuronale mediata dai radicali liberi: uno studio condotto su topi transgenici che non esprimevano il gene dell'ApoE ha dimostrato infatti che quest'ultimi possedevano incrementati livelli di stress ossidativo ed un'aumentata attivazione delle caspasi coinvolte nel processo apoptotico (Keller et al., 2000).

La stretta associazione tra il deposito dell'amiloide e lo stress ossidativo è stata ormai confermata da molti lavori: si è visto ad esempio che modelli animali portatori della mutazione del gene per

l'APP presentano un maggior numero di placche senili insieme ad un incremento di markers di danno ossidativo (Smith et al., 1998) e l'utilizzo di sostanze in grado di ridurre la produzione di radicali liberi attenua anche l'ingiuria cellulare connessa all'esposizione del peptide  $\beta$  (Subramaniam et al., 1998). Un altro studio ha dimostrato che nei topi portatori di mutazioni sia a livello del gene per l'APP che del gene codificante l'enzima manganese-superoossido-dismutasi (Mn-SOD), coinvolto nel meccanismo di protezione contro l'insulto da radicali liberi, si osserva, oltre ad un evidente accumulo di danno ossidativo, un incremento di circa sette-otto volte della aggregazione in placche del peptide  $\beta$  rispetto agli animali portatori della sola mutazione a carico del gene per l'APP (Li et al., 2004).

Tutto ciò depone quindi per il primato cronologico nel meccanismo patogenetico dello stress ossidativo, a sua volta capace di innescare un circolo vizioso che si autoalimenta e che porta alla progressiva deposizione di amiloide e alla degenerazione neuronale (Praticò, 2005).

Le principali sedi di produzione dei radicali liberi sono i mitocondri, organelli intracellulari deputati al metabolismo ossidativo: essi utilizzano per la produzione energetica più del 90% di tutto l'ossigeno disponibile e conseguentemente generano il 90% della quota di

radicali liberi della cellula (Zhu et al., 2004). E' stato quindi ipotizzato che essi possano avere un ruolo chiave nei meccanismi che sottendono la neurodegenerazione.

#### 2.4.5 I mitocondri: la sede di produzione dell'energia aerobica della cellula

I mitocondri (Fig.1) rappresentano “la centralina energetica della cellula” (Eckert et al., 2003). Sono organelli intracellulari specializzati nella produzione della maggior parte dell'energia chimica disponibile sottoforma di ATP, attraverso processi metabolici di tipo aerobio. Secondo la teoria dell'endosimbiosi, essi rappresentano il prodotto evolutivo di antichi procarioti incorporati nelle cellule oltre un miliardo di anni fa e come tali conservano alcune caratteristiche peculiari delle cellule batteriche, quali una parete cellulare corrispondente alla loro membrana esterna, un DNA proprio e l'assenza di nucleo (DiMauro et al., 2004). Sono delimitati da una membrana esterna e da una membrana interna, che si approfonda in pieghe o invaginazioni, dette *cristae*, capaci di aumentare notevolmente la superficie disponibile ad ospitare i complessi enzimatici necessari al metabolismo ossidativo. A loro volta queste membrane dividono gli organelli in due compartimenti, lo spazio

intermembrane e la matrice mitocondriale al centro, la quale presenta la consistenza di un gel per l'alta concentrazione di proteine idrosolubili (fino a 500mg/ml). Le due membrane hanno proprietà molto differenti. La membrana esterna è formata per circa il 50% da lipidi e risulta particolarmente permeabile, consentendo a molecole fino a un diametro di 10.000 Da di passare liberamente nello spazio intermembrane, che quindi diventa continuo con il citosol per la maggior parte dei soluti. La membrana interna si caratterizza invece per un alto rapporto proteine/lipidi (circa 1 molecola di proteine ogni 15 fosfolipidi), è priva di colesterolo e ricca di un insolito fosfolipide, la cardiolipina, presente anche nella membrana plasmatica dei batteri, di cui probabilmente la membrana interna rappresenta l'evoluzione; essa inoltre, a differenza di quella esterna, è altamente impermeabile e praticamente qualsiasi molecola o ione richiede uno speciale trasportatore per poter entrare nella matrice mitocondriale (Karp, 2002).

Il mitocondrio è il centro del metabolismo ossidativo della cellula: al suo interno hanno luogo processi metabolici, quali il ciclo degli acidi tricarbossilici (anche detto il ciclo di Krebs) e la catena di trasporto degli elettroni associata al meccanismo di fosforilazione ossidativa (Fig.2), in grado di generare, a partire dai due prodotti della glicolisi,

il piruvato e il NADH, energia chimica immagazzinata sottoforma di ATP.

Le molecole di piruvato vengono trasportate attraverso la membrana mitocondriale interna nella matrice dove, ad opera dell'enzima piruvato deidrogenasi, sono decarbossilate a gruppi acetile e condensate con il coenzima A per formare l'acetylCoA. Quest'ultimo entra a sua volta nel ciclo degli acidi tricarbossilici, che si caratterizza per una serie di reazioni attraverso le quali cinque paia di elettroni sono rimosse dalle molecole di substrato e trasferite ad accettori di elettroni ad alto potenziale riduttivo, con formazione di NADH e FADH<sub>2</sub>. Degli otto enzimi che fanno parte del ciclo di Krebs, solo la succinodeidrogenasi risulta legata alla membrana interna, mentre gli altri sono disciolti nella matrice. I NADH e i FADH<sub>2</sub> formati si dissociano quindi dagli enzimi deidrogenasi e trasferiscono i loro elettroni ai trasportatori associati alla membrana interna, a costituire la cosiddetta catena di trasporto degli elettroni, disposti spazialmente in ordine di potenziale redox decrescente, tale da assicurare il passaggio degli elettroni attraverso l'intera catena. Ogni trasportatore viene ridotto dall'acquisto di elettroni dal trasportatore che lo precede e viene poi ossidato con la cessione di elettroni al trasportatore che segue. L'accettore finale di questo "passamano" è l'ossigeno

molecolare che è ridotto ad acqua. I trasportatori di elettroni (flavoproteine, citocromi, ubiquinone e proteine ferro-zolfo) sono organizzati in quattro complessi distinti e asimmetrici, che attraversano completamente la membrana, definiti come complessi I, II, III e IV; solo due dei componenti della catena di trasporto degli elettroni, il citocromo *c* e l'ubichinone (coenzima Q10), sono presenti come unità indipendenti, in grado di muoversi all'interno o lungo la membrana, funzionando come navetta di elettroni tra i grossi complessi proteici, relativamente immobili. Ciascun complesso transmembrana è formato da più subunità proteiche: il complesso I (NADH-UQ ossidoreduttasi) consta di 46 subunità, il complesso II (succinato-UQ ossidoreduttasi) di 4 subunità, il complesso III (UQH<sub>2</sub>-citocromo *c* ossidoreduttasi) di 11 subunità e il complesso IV (citocromo *c*-O<sub>2</sub> ossidoreduttasi o citocromo *c* ossidasi o COX) di 13 subunità. L'energia libera rilasciata dal trasferimento degli elettroni è utilizzata per la creazione di un gradiente elettrochimico ( $\Delta\Psi$  e  $\Delta\text{pH}$ ) a cavallo della membrana interna attraverso la traslocazione e l'accumulo di ioni idrogeno nello spazio intermembrane. La forza motrice protonica generata a sua volta permette la sintesi di ATP ad opera del complesso V (F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>ATP-sintetasi), una struttura transmembrana contenente il sito catalitico e costituita da 16 subunità

(DiMauro e Schon, 2003) : questo processo prende il nome di fosforilazione ossidativa (Karp, 2002).

I mitocondri sono i soli organelli della cellula al di fuori del nucleo a contenere un proprio DNA ed un proprio macchinario per la sintesi di RNA e proteine.

La scoperta del genoma mitocondriale risale al 1963 (Nass e Nass): esso è costituito da molteplici copie di una piccola molecola di DNA circolare a doppio filamento (mtDNA) (Fig.3). La sequenza del mtDNA umano consta di 16569 bp e contiene 37 geni: 2 geni per RNA ribosomali, 22 geni per RNA di trasferimento (tRNA) e 13 geni strutturali codificanti per alcune delle subunità dei complessi multimerici coinvolti nella fosforilazione ossidativa (DiMauro e Davidzon, 2005); in particolare i geni mitocondriali codificano per sette subunità del complesso I, una subunità del complesso III, tre subunità del complesso IV e due subunità del complesso V (Fig.4). Da ciò si deduce che la maggior parte dei circa 900 prodotti genici presenti nell'organello sono codificati dal DNA nucleare (nDNA) e poi importati dal citoplasma. In aggiunta il mtDNA presenta una regione di controllo (*control region* o CR) di 1 Kb, non codificante, che contiene sequenze regolatrici della trascrizione e della replicazione.

La genetica mitocondriale differisce dalla genetica mendeliana essenzialmente per tre aspetti maggiori: l'eteroplasmia associata al cosiddetto effetto soglia, la segregazione mitotica e l'eredità matrilineare.

In ciascuna cellula sono presenti centinaia di mitocondri e ciascun mitocondrio può contenere da due a dieci copie di mtDNA (fenomeno della *poliplasmia*). Normalmente tutte le molecole di mtDNA sono tra loro identiche (*omoplasmia*), ma se è presente una mutazione, questa può essere riscontrabile in tutte le altre molecole oppure si può realizzare quella situazione conosciuta come *eteroplasmia*, in cui coesistono, nella stessa cellula o nello stesso tessuto, due popolazioni di mtDNA: una normale (tipo selvaggio) e una mutante. Nell'espressione fenotipica delle mutazioni mitocondriali risulta quindi importante anche la quantità assoluta delle due specie di DNA e si realizza un fenotipo patogeno solo in quei tessuti le cui cellule contano un numero di molecole mutanti superiore ad una certa soglia (*effetto soglia*). Il valore soglia varia tra individui, tra diversi organi e tra diverse cellule di uno stesso tessuto, poiché dipende dal grado di suscettibilità alla disfunzione del metabolismo ossidativo. Inoltre tale vulnerabilità metabolica può variare nello stesso tessuto col passare del tempo se cambiano le esigenze funzionali: infatti l'espressione dei

geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa è tessuto-specifica, essendo la produzione dei complessi enzimatici del metabolismo ossidativo proporzionale al grado di attività metabolica, ossia alle richieste energetiche dei tessuti (DiMauro e Schon, 2003).

Durante la divisione cellulare, i mitocondri vengono distribuiti casualmente alle cellule figlie e questa ripartizione stocastica è detta *segregazione replicativa o mitotica* (Wallace e Lott, 1993). In conseguenza di tale fenomeno, quando una cellula eteroplasmica si divide, si potrà avere una cellula figlia con una più alta percentuale di molecole di mtDNA mutanti ed una in cui prevalgono i genomi selvatici.

Il mtDNA è ereditato seguendo la linea materna, poiché le copie di mtDNA degli spermatozoi che penetrano nella cellula uovo al momento della fecondazione sono degradate (Sutovsky et al., 1999) per ragioni ancora non ben chiarite.

Mutazioni nel genoma mitocondriale sono state associate ad un gran numero di manifestazioni cliniche, a partire dal 1988 quando Wallace e collaboratori identificarono per la prima volta il gene mitocondriale responsabile della neuropatia ottica ereditaria di Leber. Molte delle mutazioni studiate risultano in alterazioni della catena respiratoria e della fosforilazione ossidativa e si esprimono in malattie

che, coinvolgendo principalmente il sistema nervoso centrale e i muscoli, vengono collettivamente indicate con il nome di *encefalomiopatie mitocondriali* (DiMauro et al., 2003).

#### 2.4.6 Disfunzione mitocondriale nel processo dell'invecchiamento

Il coinvolgimento del mtDNA nel fisiologico processo dell'invecchiamento, principalmente come causa di aumentata produzione di radicali liberi, in accordo con la “*mitochondrial-free-radical hypothesis*” precedentemente descritta, è stato confermato da una serie di lavori pubblicati nel corso di questi ultimi anni. Il mitocondrio infatti è da considerare come la più importante sorgente dei ROS e allo stesso tempo ne rappresenta il principale bersaglio per la stretta vicinanza dei suoi componenti alla sede di produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Il suo DNA inoltre risulta particolarmente suscettibile al danno ossidativo per la mancanza di istoni e la presenza in parte di meno efficienti meccanismi riparativi (Cassarino e Bennett, 1999).

La maggiore teoria dell'invecchiamento ipotizza che alterazioni dei geni mitocondriali, quali delezioni e mutazioni puntiformi che si accumulano progressivamente con l'avanzare dell'età (Cortopassi e Wang, 1995; Wei et al., 1996; Wallance et al., 1997; Melov et al.,

1999; Michikawa et al., 1999; Lin et al., 2002), possano contribuire a ridurre la funzionalità di uno o più complessi della catena respiratoria, bloccando in tal modo il meccanismo di trasporto degli elettroni e incrementando il livello di generazione di radicali liberi e conseguentemente il danno al mtDNA in un circolo vizioso (Beal, 2005).

Il danno del mtDNA che accompagna il fisiologico processo dell'invecchiamento potrebbe venir amplificato da altri fattori specifici e diventare quindi uno dei punti chiave nella progressione delle malattie neurodegenerative età-correlate (Zhu et al., 2004a). Le ricerche degli ultimi dieci-quindici anni sono state condotte nell'ottica di dimostrare un coinvolgimento del mitocondrio e dei difetti della fosforilazione ossidativa nelle patologie degenerative che colpiscono la popolazione anziana, incluse le forme sporadiche della demenza di Alzheimer (Cassarino e Bennet, 1999; Orth e Schapira, 2001; Beal, 2005).

#### 2.4.7 Disfunzione mitocondriale e malattia di Alzheimer

La disfunzione mitocondriale è probabilmente uno degli eventi più precoci che si instaurano nel corso della malattia di Alzheimer: i mitocondri danneggiati diventerebbero meno efficienti produttori di

ATP e più efficienti produttori di radicali liberi (Castellani et al., 2002) e il tutto condurrebbe ad uno stato di stress ossidativo cronico.

Difetti del metabolismo energetico sono una caratteristica consistente del cervello affetto da malattia di Alzheimer. Esiste infatti una stretta associazione tra l'insorgenza del decadimento cognitivo e la compromissione della produzione energetica a livello cerebrale; la comparsa di anomalie metaboliche sembra inoltre precedere di circa dieci anni l'esordio clinico di malattia (Small et al., 1995).

Importanti informazioni sono state ottenute con l'introduzione della PET che ha evidenziato una riduzione del metabolismo a livello della corteccia parieto-temporale in pazienti con diagnosi probabile di demenza di Alzheimer (Minoshima et al., 1997; Vander Borghet et al., 1997). Dal momento che la stessa atrofia cerebrale che si realizza in corso di malattia potrebbe creare artefatti nell'uso di questa tecnica di neuroimaging, è importante sottolineare come tali cambiamenti si riscontrino ancor prima della comparsa sul piano clinico di una compromissione neuropsicologica e di atrofia documentabile con le metodiche di tomografia computerizzata o risonanza magnetica (Blass et al., 2000).

Studi condotti su tessuto cerebrale post-mortem hanno dimostrato che nei pazienti Alzheimer rispetto ai controlli si osserva una riduzione

nella attività di alcuni enzimi coinvolti nel ciclo degli acidi tricarbossilici: in particolare si evidenzia una deficienza a carico del complesso piruvato deidrogenasi (PDHC) e del complesso  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi ( $\alpha$ KGDHC) (Sorbi et al., 1983; Butterworth e Besnard, 1990; Mastrogiacoma et al., 1996). E' stato notato inoltre che nei pazienti portatori del genotipo ApoE4 il grado di compromissione della funzione enzimatica si correla meglio alla gravità del quadro clinico di quanto non avvenga per il numero di placche senili e grovigli neurofibrillari (Gibson et al., 2000a).

Recentemente Bubber e collaboratori hanno realizzato un'analisi completa dell'attività dell'intero macchinario enzimatico del ciclo di Krebs nel tessuto cerebrale di pazienti Alzheimer, confermando il decremento dell'attività di PDHC e  $\alpha$ KGDHG, assieme ad una significativa riduzione anche dell'attività della isocitrato deidrogenasi; gli enzimi succinato deidrogenasi e malato deidrogenasi mostrano invece un'aumentata attività, mentre tutti gli altri risultano invariati. Inoltre questo lavoro di nuovo evidenzia come l'entità delle anomalie enzimatiche sia strettamente correlata al declino cognitivo (Bubber et al., 2005).

Nei pazienti con malattia di Alzheimer si osserva anche una compromissione della funzione della citocromo *c* ossidasi o COX

(complesso IV della catena respiratoria), enzima terminale deputato alla riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua. La ridotta attività della citocromo *c* ossidasi è stata riscontrata da molti autori nell'ippocampo, nella corteccia temporale (Kish et al., 1992; Mutisya et al., 1994; Simoniam e Hyman, 1994; Nagy et al., 1999; Maurer et al., 2000; Cottrell et al., 2001; Bosetti et al., 2002) e a livello dei tessuti periferici nelle piastrine (Parker et al., 1990) e nei fibroblasti (Curti et al., 1997) di pazienti affetti da forme sporadiche di demenza di Alzheimer.

Il coinvolgimento di altri complessi della fosforilazione ossidativa appare invece più controverso. Cardoso e collaboratori, lavorando su mitocondri isolati da piastrine, non hanno trovato differenze significative tra pazienti e controlli nell'attività dei complessi I, II e III, sebbene sia documentabile una riduzione nella produzione di ATP (Cardoso et al., 2004). Un altro studio ha recentemente riportato che l'alterata attività di COX nelle piastrine e nei neuroni dell'ippocampo non è associata ad una compromissione di F1-F0ATP sintetasi (Bosetti et al., 2002).

Le modificazioni enzimatiche che si osservano nei soggetti con malattia di Alzheimer hanno un'inevitabile ripercussione sul metabolismo energetico della cellula. La conseguenza funzionale del

decremento della attività di COX è stata indagata tramite la misurazione della concentrazione ematica dell'acido lattico, prodotto terminale della glicolisi anaerobica, dopo test incrementale da sforzo utilizzato per lo screening metabolico nei pazienti con patologie mitocondriali (Siciliano et al., 1996): la concentrazione del lattato è risultata significativamente più alta nei pazienti Alzheimer ed inversamente correlata con l'attività piastrinica di COX (Mancuso et al., 2003), confermando come anche tessuti periferici possano esibire anomalie del metabolismo ossidativo nella malattia di Alzheimer.

Le anomalie funzionali del ciclo di Krebs e della catena respiratoria inducono quindi inevitabilmente un'alterazione del metabolismo energetico e portano ad un'incrementata produzione di specie reattive dell'ossigeno; il superamento di una determinata soglia critica per la cellula contribuisce a realizzare una modificazione dello stato di permeabilità della membrana mitocondriale che sottende l'innescamento della morte cellulare programmata alla base del processo neurodegenerativo (Bubber, 2005).

#### 2.4.8 Il ruolo del mitocondrio nell'apoptosi

Il mitocondrio svolge infatti un ruolo critico e di primo piano nei processi che inducono la cellula all'apoptosi (Fig.5). Per apoptosi si

intende un meccanismo di morte cellulare programmata che sottende l'attivazione sequenziale di eventi coordinati internamente alla cellula e messi in atto da una serie di prodotti genici specifici. L'apoptosi si può realizzare in condizioni fisiologiche (durante l'embriogenesi, come meccanismo omeostatico di mantenimento delle popolazioni cellulari all'interno di un tessuto, come strumento di difesa nelle reazioni immunitarie) oppure come risposta ad un agente patogeno o lesivo (Cotran et al., 2000). Una sua disregolazione è alla base di molte malattie, incluse quelle neurodegenerative (Reed, 2000).

Fattore chiave per l'innescamento della morte cellulare programmata è rappresentato dallo stato di transizione della permeabilità della membrana mitocondriale (*mitochondrial permeability transition*, MPT), regolata dalla presenza di canali transmembrana voltaggio-dipendenti che permettono il passaggio di ioni o composti di peso molecolare massimo di 1,5 kDa. Una compromissione della fosforilazione ossidativa determina conseguentemente la riduzione del potenziale di membrana, con apertura dei canali e rilascio del citocromo *c* nel citoplasma. Il citocromo *c* va a legarsi ad Apaf-1 (fattore attivante le proteasi pro-apoptotiche-1), che a sua volta porta all'attivazione della cascata delle caspasi, deputate alla fase effettrice del processo apoptotico (Chong et al., 2005). La transizione della

permeabilità mitocondriale determina inoltre l'aumento della concentrazione citoplasmatica dello ione calcio (normalmente sequestrato all'interno del mitocondrio), con successiva attivazione di enzimi potenzialmente dannosi per la cellula, quali fosfolipasi (che contribuiscono al danno di membrana), proteasi (che distruggono proteine di membrana e del citoscheletro) ed endonucleasi (che inducono la frammentazione della cromatina) (Cassarino e Bennet, 1999).

Rimane da chiarire cosa determini la ridotta attività degli enzimi mitocondriali. Sappiamo che la  $\beta$ -amiloide può avere un'azione tossica diretta sui mitocondri ed innescare essa stessa l'apoptosi (Chong et al., 2005). E' stato dimostrato che l'esposizione dei mitocondri isolati al peptide  $A\beta$  determina l'apertura dei canali voltaggio-dipendente, con conseguente transizione dello stato di permeabilità e rigonfiamento mitocondriale (Bachurin et al., 2003). Studi condotti su tessuto cerebrale indicano che  $A\beta$  è capace di indurre il rilascio del citocromo *c*, così come di altri fattori pro-apoptotici mitocondriali attraverso la primitiva modificazione della permeabilità (Kim et al., 2002). L'amiloide si dimostra inoltre in grado di alterare il metabolismo energetico tramite l'inibizione dell'attività di vari enzimi mitocondriali, quali  $\alpha$ -chetoglutarato

deidrogenasi, piruvato deidrogenasi e citocromo *c* ossidasi (Gibson et al., 2000b; Eckert et al., 2003): l'incubazione di neuroni corticali con frammenti di peptide A $\beta$  altera infatti la funzione della catena respiratoria con conseguente riduzione della concentrazione cellulare di ATP (Casley et al., 2002).

Più recentemente è stato osservato che nel tessuto cerebrale di pazienti Alzheimer il peptide A $\beta$  è presente a livello della matrice mitocondriale in associazione all'enzima alcoldeidrogenasi ( *$\beta$ -amyloid binding alcohol dehydrogenase, ABAD*) e questo potrebbe rappresentare il collegamento molecolare diretto tra l'amiloide e la tossicità mitocondriale (Lustbader et al., 2004): si è visto infatti che l'inibizione di tale interazione in vitro sopprime l'innescò dell'apoptosi e la generazione di radicali liberi. Inoltre vi sono evidenze che il precursore del peptide A $\beta$  risulti direttamente associato alla membrana mitocondriale esterna (Anandatheerthavarada et al., 2003) e che la  $\gamma$ -secretasi, enzima deputato al processamento dell'APP, sia presente a livello del mitocondrio (Hansson et al., 2004). Potremmo inoltre ipotizzare che nel determinismo delle alterazioni enzimatiche che si osservano nella malattia di Alzheimer concorrano anche mutazioni ereditate a carico del mtDNA. Tale ipotesi sembrerebbe meglio spiegare le forme sporadiche ad esordio tardivo

di demenza di Alzheimer, nelle quali l'incrementata produzione della  $\beta$ -amiloide non è giustificata dalla presenza di mutazioni causative di specifici geni e potrebbe quindi rappresentare un evento secondario in risposta ad una primitiva compromissione mitocondriale (Swerdlow e Khan, 2004). La ridotta attività enzimatica della catena respiratoria favorirebbe la produzione aberrante di specie reattive dell'ossigeno, che a loro volta, interagendo con il mtDNA, incrementerebbero il tasso di mutazioni (Fig.6).

Un importante contributo alla comprensione del peso del genoma mitocondriale nell'insorgenza dei deficit bioenergetici della malattia di Alzheimer è stato ottenuto grazie all'utilizzo delle cosiddette *cytoplasmatic hybrid cells* ("cybrid cells"). La tecnica, descritta per la prima nel 1989 (King e Attardi, 1989), consiste nel trasferimento di mitocondri con proprio genoma da piastrine umane in colture cellulari prive del loro mtDNA. In tal modo se si riscontrano differenze fenotipiche nelle *cybrid cells*, queste sono sicuramente determinate dalla presenza del mtDNA esogeno e non dipendono da altri fattori nucleari o ambientali.

Geni mitocondriali di pazienti affetti da forma sporadica di demenza di Alzheimer espressi nelle *cybrid cells* inducono una riduzione dell'attività del complesso IV, una riduzione della produzione di ATP

ed un incremento dello stato di stress ossidativo (Swerdlow et al., 1997) e tali difetti bioenergetici tendono a diventare più severi durante i passaggi in coltura. I mitocondri poi a lungo termine si presentano anomali e marcatamente danneggiati (Trimmer et al., 2004). In aggiunta le *cybrid cells* dei soggetti Alzheimer si caratterizzano per un' aumentata formazione di peptidi amiloidogenici (sia A $\beta$ 40 che A $\beta$ 42) durante attivazione delle caspasi e per l' accumulo di depositi di amiloide colorabili con rosso Congo del tutto simili alle placche senili cerebrali (Khan et al., 2000). Recenti studi hanno inoltre dimostrato che lo status ossidativo delle *cybrid cells* rende quest' ultime più vulnerabili all' azione tossica di A $\beta$ 40 (Cardoso et al., 2004) perché si realizza un' eccessivo decremento del potenziale di membrana mitocondriale, con conseguente alterazione della permeabilità, rilascio del citocromo *c* ed innesco del meccanismo apoptotico. Il potenziale può essere normalizzato attraverso l' esposizione delle cellule a ciclosporina A o a sostanze antiossidanti (Khan et al., 2000). Thiffault e Bennet hanno poi osservato come le fluttuazioni di potenziale derivino dalla interazione di più fattori, quali il flusso di elettroni della catena respiratoria, la sintesi di ATP e l' estrusione mitocondriale di calcio; le fluttuazioni sono ridotte nelle *cybrid cells* ad indicare che probabilmente l' espressione del mtDNA

di pazienti Alzheimer ha importanti e complesse ripercussioni non solo sull'attività di COX (Thiffault e Bennet, 2005).

Questi studi sembrano quindi concordi nell'affermare che il fenotipo delle *cybrid cells* ricorda le modificazioni osservate in vivo nei pazienti con malattia di Alzheimer e rinforzano il concetto che anomalie del mtDNA potrebbero essere primariamente coinvolte ed all'origine dell'incrementato stress ossidativo e del deposito di  $\beta$ -amiloide nelle placche senili.

#### 2.4.9 Ruolo patogeno di mutazioni del mtDNA nella malattia di Alzheimer

Molti gruppi di ricerca stanno lavorando con l'intento di individuare e definire specifiche mutazioni a carico del mtDNA responsabili del fenotipo osservato nelle *cybrid cells* e potenziali candidate a svolgere un ruolo patogenetico, ma ad oggi i dati a disposizione sono tra loro in parte discordanti e l'esatto ruolo di mutazioni puntiformi o variazioni polimorfiche rimane da chiarire.

E' stato osservato nei mitocondri isolati da tessuto cerebrale di soggetti con malattia di Alzheimer un aumento di circa 15 volte della "common deletion" (Corral-Debrinski et al., 1994), la più frequente delezione di 4977 bp riscontrata nel mtDNA, che con

l'invecchiamento tende ad accumularsi preferenzialmente nei tessuti ad alto consumo energetico di tipo aerobico, quali il cervello e il muscolo (Lezza et al., 1999).

Il gruppo di Wallace e Beal ha recentemente dimostrato la presenza di un significativo tasso di mutazioni a livello della regione di controllo CR del mtDNA: in particolare è stato evidenziato come due cambiamenti eteroplasmici siano specifici del tessuto cerebrale dei soggetti con demenza di Alzheimer (T414G, presente in ben il 65% dei pazienti, e T477C). Inoltre lo stesso studio, tramite la clonazione ed il sequenziamento della regione di controllo del mtDNA, ha rilevato che mutazioni eteroplasmiche a questo livello sono più frequenti nei pazienti Alzheimer, con un incremento medio rispetto ai controlli del 63% e ben del 130% nei pazienti al di sopra degli ottant'anni; lo studio dimostra infine una riduzione media del contenuto del mtDNA pari al 50% nei soggetti affetti (Coskun et al., 2004). Queste mutazioni, coinvolgendo elementi regolatori cruciali per la replicazione e la trascrizione del mtDNA, potrebbero deteriorare l'omeostasi mitocondriale e contribuire alle dannose conseguenze funzionali nel momento in cui raggiungono una soglia critica a livello delle cellule post-mitotiche neuronali.

Un precedente lavoro condotto da Chinnery e collaboratori su un vasto numero di campioni di tessuto cerebrale di soggetti anziani sani, soggetti con malattia di Alzheimer e soggetti con demenza a corpi di Lewy aveva invece raggiunto risultati discordanti, non rilevando la presenza di mutazioni puntiformi eteroplasmiche specifiche (T414G) a carico della regione di controllo in nessuno dei tre gruppi (Chinnery et al., 2001).

Elson e collaboratori (2006) hanno sequenziato la regione codificante completa del mtDNA ottenuto da 145 campioni di tessuto cerebrale di pazienti affetti da demenza di Alzheimer e da 128 controlli, con l'intento di studiare eventuali differenze nel carico mutazionale, ma hanno riscontrato un medesimo tasso di sostituzioni nucleotidiche e di mutazioni sinonime e non silenti tra i due gruppi oggetto di studio.

## **2.5 Gli aplogruppi mitocondriali**

Un valido strumento per determinare se eventuali polimorfismi mitocondriali possano agire come fattori di suscettibilità o di protezione nell'insorgenza della malattia di Alzheimer è stato fornito dalla analisi degli aplogruppi mitocondriali.

Gli aplogruppi mitocondriali sono clusters di genomi mitocondriali continente-specifici correlati alla evoluzione e definiti in base alla presenza di ancestrali e stabili polimorfismi (Chinnery et al., 2001). È

stato ipotizzato che variazioni all'interno del mtDNA possano causare sottili differenze nelle proteine codificate ed indurre conseguentemente una modificazione, seppur minima, nelle attività della fosforilazione ossidativa e nella produzione di specie reattive dell'ossigeno, o viceversa agire come fattori protettivi, con effetto benefico sulla catena di trasporto di elettroni e/o per la produzione di radicali liberi.

L'identificazione di specifici gruppi di mtDNA inizia negli anni ottanta ad opera di Wesley Brown e Douglas Wallace (Brown, 1980; Denaro et al., 1981) e vede in questo periodo il susseguirsi di numerosi lavori (Johnson et al., 1983; Santachiara-Benerecetti et al., 1988; Scozzari et al., 1998) per il crescente interesse nei confronti del mtDNA quale utile strumento per gli studi di filogenesi (Cann et al., 1987). Due aspetti rendono infatti il mtDNA particolarmente adatto agli studi sull'evoluzione del genere umano: da una parte il fatto che esso venga trasmesso solo per via materna e non sia sottoposto a ricombinazione, dall'altra che il suo tasso di variabilità sia molto più alto di quello che si osserva nel genoma nucleare (Ingmann et al., 2000; Richards e Macaulay, 2001). Un sostanziale numero di mutazioni si sono quindi sequenzialmente accumulate lungo le varie linee materne che sono andate progressivamente incontro a divergenza

mentre le popolazioni colonizzavano differenti continenti ed aree geografiche. La presenza di stabili siti polimorfici all'interno della regione codificante definisce l'aplogruppo, mentre la maggior parte delle mutazioni che si osservano sia nelle sequenze codificanti che nella regione di controllo e che si realizzano all'interno di preesistenti aplogruppi definiscono il tipo individuale di mtDNA, o aplotipo (Torrioni et al., 1993; Graven et al., 1995).

Ciascuno dei tre maggiori gruppi etnici (Africani, Asiatici e Americani nativi, ed Europei) risulta associato ad un proprio set di aplogruppi mitocondriali (Howell et al., 2005); in Europa un'analisi filogenetica condotta da Torrioni e collaboratori su tre campioni di popolazione (Finlandese, Svedese ed Italiano, in particolare della regione Toscana), rappresentativi della popolazione dell'intero continente, ha identificato la presenza di nove aplogruppi specifici della popolazione caucasica: H, I, K, J, T, U, V, W e X (Torrioni et al., 1996).

In questi ultimi anni la ricerca è stata finalizzata alla comprensione di un eventuale ruolo degli aplogruppi nella modulazione dell'espressione dei geni mitocondriali durante l'evoluzione e i processi di adattamento del genere umano; si è iniziato inoltre ad indagare se la variabilità del genoma mitocondriale potesse svolgere

un'azione protettiva o viceversa agire come fattore di rischio nell'insorgenza di un eventuale patologia.

A questo proposito sono state dimostrate interessanti associazioni tra aplogruppi e il quoziente intellettivo (Skuder et al., 1995), il grado di motilità degli spermatozoi (Ruiz-Pesini et al., 2000), la capacità di adattamento a fredde condizioni climatiche (Ruiz-Pesini et al., 2004) e la longevità (Tanaka et al., 1998; De Benedictis et al., 1999; Zhang et al., 2002). È stato inoltre dimostrato che specifici aplogruppi mitocondriali possono favorire la penetranza fenotipica della neuropatia ottica di Leber (Howell et al., 2003) e rivestire un ruolo di suscettibilità genetica per alcune patologie, quali la cardiomiopatia (Shin et al., 2000), la sclerosi multipla (Kalman et al., 1999) e malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (van der Walt, 2003), la malattia di Friedreich (Giacchetti et al., 2004), la sclerosi laterale amiotrofica (Mancuso et al., 2004).

La frequenza degli aplogruppi mitocondriali è stata anche studiata in soggetti con malattia di Alzheimer con l'intento di comprendere un loro eventuale coinvolgimento nel meccanismo patogenetico.

Un lavoro condotto da Carrieri e collaboratori (2001) su pazienti affetti da malattia di Alzheimer ha suggerito che gli aplogruppi K e U potessero influenzare il rischio della malattia nella popolazione

caucasica neutralizzando l'effetto del principale fattore di suscettibilità delle forme sporadiche, quale l'allele  $\epsilon 4$  dell'apolipoproteina E. Una recente analisi del gruppo di ricerca di van der Walt (van der Walt et al., 2004) riguardante una possibile associazione tra la demenza di Alzheimer e i genotipi mitocondriali ha dimostrato come l'aplogruppo U determini un significativo incremento del rischio di sviluppare la malattia nella popolazione di sesso maschile, mentre si associ ad una riduzione del rischio nel sesso femminile. D'altro lato altri due lavori confutano i risultati sopradetti e non evidenziano alcuna associazione statisticamente significativa tra la variabilità del genoma mitocondriale e la malattia di Alzheimer (Chinnery et al., 2000; Elson et al., 2006).

### **3 SCOPO DELLA TESI**

Scopo della presente tesi è stato quello di valutare il possibile ruolo come fattore di rischio o di protezione degli aplogruppi mitocondriali in una popolazione di soggetti affetti da malattia di Alzheimer provenienti dalla regione Toscana, confrontando i dati genetici così ottenuti con quelli di una popolazione di controllo omogenea.

## **4 MATERIALI E METODI**

### **4.1 Selezione dei soggetti reclutati nello studio**

Il gruppo dei pazienti consiste di 210 soggetti (82 maschi, 128 femmine, età media  $74.0 \pm 7.6$ ), provenienti dalla regione Toscana, con diagnosi di malattia di Alzheimer probabile in accordo ai criteri NINCDS-ADRDA; nessuno dei pazienti selezionati risulta affetto da forme familiari di demenza di Alzheimer.

Il gruppo dei controlli consiste di 191 soggetti (98 maschi, 93 femmine, età media  $69.1 \pm 6.6$ ), provenienti dalla regione Toscana, non consanguinei dei pazienti, non affetti da patologie di natura neurodegenerativa, con anamnesi familiare negativa per malattia di Alzheimer.

I soggetti arruolati sono stati sottoposti all'esecuzione di un prelievo ematico, previo consenso informato da parte di ciascuno di loro o da parte dei familiari. Il presente studio ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico di competenza.

## **4.2 Descrizione dei metodi utilizzati per l'analisi degli aplogruppi mitocondriali**

### *4.2.1 Estrazione del DNA*

Il DNA genomico è stato estratto da 200 µl sangue intero trattato con anticoagulante K+EDTA utilizzando il kit commerciale “NucleoSpin Tissue” (MACHEREY-NAGEL), in accordo con i protocolli standard (Sambrook e Russel, 2001).

L'estrazione consiste in una serie di passaggi successivi, il primo dei quali prevede la lisi cellulare e la digestione della matrice proteica, ottenute mediante l'aggiunta rispettivamente di 200 µl di buffer e 25 µl di proteinasi K. Il campione di sangue viene incubato a 70°C per 10 minuti. Si aggiungono quindi 200 µl di etanolo assoluto (96-100%) freddo, che determina la precipitazione del DNA. Ad ogni passaggio è sempre necessario vorticare brevemente la soluzione per favorire l'interazione tra i reagenti e conseguentemente la reazione che desideriamo ottenere.

Il campione viene poi trasferito nella colonna di estrazione e centrifugato per 1 minuto a 11000 rcf, in modo tale che il DNA rimanga adeso alla membrana di silice della colonna. Si inizia quindi una serie di lavaggi con appositi buffer forniti dal kit, che liberano il

DNA legato alla membrana da eventuali impurità. L'ultima fase consiste nel processo di eluizione in acqua sterile o buffer di eluizione, che determinano per effetto meccanico il distacco del DNA dalla colonna. La concentrazione e il grado di purezza del DNA estratto sono valutati tramite lettura spettrofotometrica a 260, 280 nm di lunghezza d'onda.

#### 4.2.2 Reazione a catena della polimerasi (Polymerase chain reaction, PCR)

Le regioni del genoma mitocondriale contenenti i siti polimorfici caratteristici di ciascun aplogruppo europeo (H, I, J, K, T, U, V, W e X) sono stati amplificati con la metodica della PCR tramite l'utilizzo di primers specifici per il mtDNA (Tab. 3 e 4), in accordo con il protocollo di Mancuso e collaboratori (2004). La nomenclatura dei siti di restrizione è stata data in accordo alla versione rivisitata di Cambridge Reference Sequences (Andrews et al., 1999).

La tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) è una metodica in vitro in grado di sintetizzare e di amplificare un frammento di DNA specifico, grazie all'utilizzo di una DNA-polimerasi termostabile (Taq-polimerasi), in grado di sopportare temperature molto elevate, e di oligonucleotidi specifici

complementari alle sequenze fiancheggianti il frammento di interesse.

La PCR consiste di tre fasi:

- una fase di denaturazione del DNA (da 92 a 95°C);
- una fase di annealing (da 50 a 70°C), durante la quale i primers specifici si attaccano ai frammenti complementari del DNA stampo;
- una fase di estensione (da 69 a 72°C) in cui avviene l'allungamento del frammento specifico.

I cicli di PCR variano da 20 a 35 e la reazione avviene all'interno di un termocicizzatore in grado di variare la temperatura (Karp, 2002).

Per l'amplificazione delle regioni polimorfiche del mtDNA sono state utilizzate le seguenti condizioni di PCR: 94°C per 3 minuti, seguiti da 30 cicli a 94°C per 1 minuto, 50°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto e una fase finale a 72°C per 7 minuti.

#### 4.2.3 Digestione dei segmenti amplificati del mtDNA con la tecnica

##### RFLP

In biologia molecolare la sigla RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*, polimorfismo da lunghezza dei frammenti di restrizione) sta ad indicare una metodica che consente di mettere a confronto le varie molecole di DNA, grazie alle differenze presenti nelle sequenze nucleotidiche.

Il DNA amplificato mediante PCR viene digerito mediante specifici enzimi di restrizione detti endonucleasi, che attuano il taglio unicamente in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche, specifiche per ogni enzima. I frammenti di restrizione vengono quindi separati per lunghezza mediante elettroforesi su gel di agarosio (Karp, 2002).

I segmenti di mtDNA amplificati mediante la tecnica della PCR sono stati sottoposti a digestione enzimatica con specifiche endonucleasi di restrizione (Tab.4) e i frammenti risultanti sono stati analizzati tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2%.

### **4.3 Tipizzazione del genotipo dell'ApoE**

Tutti i pazienti sono stati studiati per la determinazione del genotipo ApoE. Sono state eseguite PCR con specifici primers alle seguenti condizioni: 95°C per 10 minuti, seguiti da 30 cicli a 95°C per 30 secondi, 67°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi, ed una fase finale a 72°C per 7 minuti. Sono state quindi effettuate le digestioni enzimatiche tramite la tecnica RFLP con l'enzima HhaI, che produce un pattern elettroforetico distinto per ognuno dei sei possibili genotipi ( $\epsilon_2/\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_4/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_3$ ,  $\epsilon_2/\epsilon_4$ ,  $\epsilon_3/\epsilon_4$ ). I frammenti risultanti sono

stati analizzati tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2% (Hixon e Vernier, 1990).

#### **4.4 Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata condotta tramite il software SPSS. È stata utilizzata la regressione logistica per valutare l'*odds ratio* (OR) dei soggetti portatori di specifici aplogruppi. Dal momento che l'aplogruppo è una variabile indipendente costituita da più di due categorie, vi sono molte possibilità di scelta del gruppo di riferimento. Nella presente tesi è stato scelto l'aplogruppo H come gruppo di riferimento perché quello maggiormente rappresentato all'interno della popolazione.

## 5 RISULTATI

Tutti gli aplogruppi europei (H, I, J, K, T, U, V, W, X) sono stati riscontrati sia nel gruppo dei pazienti che dei controlli, in accordo con precedenti studi condotti su popolazione europea. L'8.1% dei pazienti e il 10.9% dei controlli (differenza questa non significativa) sono stati classificati come "altro", in quanto non rispondenti alle caratteristiche dei nove aplogruppi. Questi soggetti possono sia appartenere ad aplogruppi rari (non indagati), oppure presentare una mutazione silente in una regione del frammento da amplificare che ne impedisce l'amplificazione o la digestione enzimatica. L'aplogruppo H è risultato il più frequente, presente nel 43,8% dei pazienti e nel 41,4% dei controlli (vedi Tab. 5), così come in precedenti studi (Torrioni et al., 1996; Simoni et al., 2000).

La frequenza degli aplogruppi non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra pazienti e controlli (vedi Tab. 6), né è stata rilevata alcun tipo di associazione tra gli aplogruppi ed il sesso.

Per valutare una eventuale correlazione tra gli aplogruppi e l'allele  $\epsilon 4$  dell'ApoE, i pazienti sono stati suddivisi in due sottogruppi, portatori dell'allele  $\epsilon 4$  e non portatori, ma non è stata osservata una differenza statisticamente significativa della distribuzione degli

aplogruppi (Tab.7), ad indicare l'assenza di una associazione tra le due variabili.

## **6 DISCUSSIONE**

Le attuali conoscenze suggeriscono che la malattia di Alzheimer abbia un'eziologia eterogenea e multifattoriale.

Lo stress ossidativo è stato chiamato in causa come importante fattore implicato nella patogenesi della malattia in base all'osservazione che, accanto ai reperti anatomopatologici tipici della malattia, si ha evidenza di danno mediato da specie reattive dell'ossigeno, non soltanto a livello del sistema nervoso centrale ma anche a livello periferico. I radicali liberi sono molecole altamente reattive, che si formano abitualmente durante i processi metabolici delle cellule: quando la loro formazione eccede la capacità endogena di eliminarli, essi possono andare ad interagire con i componenti cellulari, modificandone la struttura spesso in modo irreversibile, con conseguente degenerazione cellulare.

Il mitocondrio rappresenta la sede primaria della produzione energetica e la principale sorgente di radicali liberi; esso svolge inoltre un ruolo di primo piano nel mantenere l'omeostasi del calcio e

nell'innescare la cascata di segnali che portano la cellula alla apoptosi (Sullivan e Brown, 2005). Per questo motivo l'attenzione della ricerca negli ultimi anni è stata finalizzata ad individuare un eventuale coinvolgimento dei mitocondri nei processi che sottendono la neurodegenerazione. Mutazioni a carico del mtDNA potrebbero infatti ridurre l'efficienza dei meccanismi di produzione energetica attraverso la fosforilazione ossidativa e allo stesso tempo incrementare la produzione di specie reattive dell'ossigeno.

Ad oggi non sono state riscontrate mutazioni causative nel mtDNA, ma numerose evidenze supportano l'ipotesi che mutazioni a questo livello si accumulino progressivamente con l'età, fino ad indurre un'alterata produzione energetica e ad incrementare la produzione di radicali liberi, in un circolo vizioso.

È stato quindi ipotizzato che i polimorfismi propri del mtDNA, che definiscono il tipo di aplogruppo, possano rendere un'individuo più suscettibile a tale danno ed innescare più precocemente il meccanismo apoptotico; all'opposto altri polimorfismi potrebbero migliorare l'attività della fosforilazione ossidativa e/o ridurre la produzione di radicali liberi.

L'analisi degli aplogruppi mitocondriali in vari campioni di popolazione può rappresentare quindi un valido strumento per

comprendere il peso di quest'ultimi nella modulazione dell'espressione dei geni mitocondriali e conseguentemente il loro ruolo nei processi di adattamento del genere umano e nel determinismo di una eventuale patologia, quali fattori di suscettibilità genetica.

Due interessanti lavori sembrano avvalorare l'ipotesi che i diversi aplogruppi siano in grado di influenzare la performance dei meccanismi alla base della produzione energetica. E' stata infatti dimostrata un'associazione tra il grado di motilità degli spermatozoi, che risente in modo particolare della funzionalità della fosforilazione ossidativa quale fonte energetica primaria, ed il tipo di aplogruppo mitocondriale (Ruiz-Pesini et al., 2002). E' stato inoltre recentemente osservato che alle alte latitudini i polimorfismi propri degli aplogruppi T, J e K sono maggiormente conservati, come se avessero rappresentato un vantaggio selettivo nei processi di adattamento alle fredde condizioni climatiche. Questi risultati potrebbero trovare una spiegazione nel fatto che tali polimorfismi siano capaci di indurre un meno efficiente accoppiamento dei meccanismi della fosforilazione ossidativa e conseguentemente una maggiore dispersione dell'energia sottoforma di calore, rappresentando quindi un vantaggio per l'adattamento ai climi freddi.

Partendo da tali premesse, lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare un eventuale ruolo di suscettibilità genetica degli aplogruppi mitocondriali nella malattia di Alzheimer.

E' stata analizzata la frequenza degli aplogruppi mitocondriali in 210 pazienti con diagnosi di malattia di Alzheimer probabile e confrontata con i dati genetici ottenuti da una popolazione di controllo omogenea, costituita da 191 soggetti. Sia il gruppo dei pazienti che il gruppo dei controlli è stato estratto dalla popolazione residente nella regione Toscana.

La frequenza degli aplogruppi non ha mostrato però alcuna differenza tra i pazienti e i controlli; inoltre nel gruppo dei pazienti non è stata riscontrata alcuna associazione tra aplogruppi, sesso ed allele  $\epsilon 4$  dell'ApoE. I suddetti dati sembrano quindi escludere un ruolo eziopatogenetico degli aplogruppi mitocondriali nella malattia di Alzheimer, almeno per quanto riguarda la popolazione della Toscana.

Tali conclusioni sono in accordo con i risultati ottenuti negli studi di Chinnery et al.(2000) ed Elson et al. (2006) (Tab.8a), ma in contrasto con altri studi, che avevano invece raggiunto differenti conclusioni (Carrieri et al., 2001; van der Walt et al., 2004) (Tab. 8a e 8b).

Chinnery e collaboratori (2000) hanno analizzato la frequenza degli aplogruppi mitocondriali in 185 soggetti con diagnosi bioptica post-

mortem di malattia di Alzheimer, in 84 soggetti con demenza a corpi di Lewy e in 179 controlli, che non presentavano alle indagini bioptiche nessuna delle alterazioni anatomopatologiche patognomiche di malattia. Non venivano precisate le origini geografiche dei soggetti reclutati. L'analisi non ha rilevato alcuna associazione tra il tipo di aplogruppo, il tipo di isoforma dell'ApoE e la malattia di Alzheimer. E' stata viceversa osservata una più alta percentuale dell'aplogruppo H rispetto alla popolazione di controllo nel gruppo dei pazienti affetti da demenza a corpi di Lewy, senza alcun tipo di correlazione con gli alleli dell'ApoE; la debolezza di tale associazione ha fatto però supporre agli autori che potesse comunque trattarsi di un risultato falso positivo, pur considerando il razionale biologico di un coinvolgimento del genoma mitocondriale nelle patologie neurodegenerative come la demenza a corpi di Lewy.

Un recente lavoro (Elson et al., 2006) ha ottenuto analoghi risultati negativi. L'analisi è stata condotta su due gruppi di campioni bioptici di tessuto cerebrale di pazienti e controlli estratti da due popolazioni diverse: il primo gruppo era costituito da 75 soggetti con malattia di Alzheimer e 64 controlli di origine statunitense, mentre il secondo gruppo da 70 pazienti e 64 controlli provenienti dal Regno Unito. La diagnosi di malattia di Alzheimer nei soggetti reclutati veniva posta in

base ai criteri anatomopatologici comunemente accettati; i soggetti reclutati come controlli non erano affetti da patologie neuropsichiatriche, inclusi accidenti cerebrovascolari, forme di demenza, depressione o psicosi. La distribuzione dei nove principali aplogruppi europei non ha dimostrato alcun tipo di associazione statisticamente significativa tra il tipo di mtDNA e lo stato di malattia sia all'interno di ciascun gruppo omogeneo per origini geografiche, sia quando i due campioni di popolazione sono stati riuniti ed analizzati nel loro insieme. Lo studio non comprendeva l'analisi di un'eventuale associazione tra il genotipo dell'ApoE ed il tipo di aplogruppo.

Risultati discordanti viceversa erano emersi da due altri studi.

Carrieri e collaboratori (2001) hanno evidenziato la presenza di un'associazione tra i tipi di aplogruppi e l'allele  $\epsilon 4$ , ipotizzandone un ruolo nei meccanismi di suscettibilità alla base della malattia di Alzheimer. Lo studio ha reclutato 213 soggetti (età media 62 anni; 85 maschi e 127 femmine) affetti dalla forma sporadica di malattia di Alzheimer, in accordo ai criteri clinici diagnostici NINCDS-ADRDA, e due gruppi di controllo, un primo gruppo comprensivo di 179 soggetti in apparente buona salute (età media 64 anni; 114 maschi e 65 femmine), un secondo di 210 soggetti centenari, liberi da manifestazioni cliniche di malattia (61 maschi e 149 femmine). Sia i

pazienti che i controlli mostravano chiare origini italiane. L'analisi non rilevava significative differenze tra i sessi per il tipo di aplogruppo o di allele dell'ApoE, ma dimostrava una differenza statisticamente significativa nella distribuzione degli aplogruppi tra i pazienti portatori dell'allele  $\epsilon 4$  e i non portatori: i pazienti che esprimevano l'allele  $\epsilon 4$  mostravano infatti una frequenza più bassa degli aplogruppi U e K (quest'ultimo rappresenta una delle sottoclassi dell'aplogruppo U). L'associazione non casuale delle due variabili considerate risultava inoltre ristretta solo al gruppo dei pazienti. Questi risultati suggerivano quindi che gli aplogruppi U e K fossero capaci di modulare l'effetto negativo esercitato dall'allele  $\epsilon 4$  e gli autori avevano ipotizzato che tale associazione fosse correlata al ruolo antiossidante dell'ApoE: in particolare si suppose che la ridotta protezione conferita dall'isoforma E4 rispetto alle isoforme E2 e E3 potesse venir compensata da una più moderata produzione di ROS secondariamente al ruolo esercitato dai polimorfismi del mtDNA caratteristici degli aplogruppi U e K.

Il lavoro di van der Walt e collaboratori (2004) ha invece confutato i risultati riguardanti l'associazione tra il tipo di aplogruppo e le isoforme dell'ApoE, ma ha osservato una differente distribuzione sesso-specifica degli aplogruppi mitocondriali all'interno del gruppo

dei pazienti. Lo studio è stato condotto su 989 soggetti con diagnosi clinica di malattia di Alzheimer secondo i criteri NINDS-ADRDA (età media  $76\pm 9,6$ ) e su 328 soggetti sani (età media  $68,1\pm 8,9$ ) reclutati come controlli, entrambi i gruppi di origini geografiche non precisate. Viene riportato che gli individui di sesso maschile portatori dell'aplogruppo U mostrano un incremento di circa 2,3 volte del rischio di sviluppare la demenza di Alzheimer, mentre nel sesso femminile il medesimo aplogruppo è in grado di ridurre il rischio del 50%. Il rischio sesso-specifico potrebbe, secondo gli autori, riflettere una differenza funzionale dei polimorfismi presenti all'interno dell'aplogruppo U, a sua volta influenzata da altri fattori associati al sesso.

In sintesi, mentre due studi dimostrano una correlazione tra aplogruppi mitocondriali e malattia di Alzheimer, altri due, in accordo con i risultati della presente tesi, non rilevano alcun nesso eziopatogenetico tra aplogruppi e malattia. Solo il lavoro di Carrieri e collaboratori dimostra un'associazione statisticamente significativa tra gli aplogruppi e il genotipo dell'ApoE nei soggetti con malattia di Alzheimer, mentre gli studi del gruppo di Chinnery e di van der Walt ed anche il presente confutano tale associazione.

Uno dei possibili motivi responsabili di queste differenze può essere l'alto tasso di variabilità degli aplogruppi non solo tra continenti, ma anche all'interno di uno stesso continente, oltre che tra etnie, che inevitabilmente rende difficile il confronto dei risultati ottenuti in campioni estratti da popolazioni di diverse aree geografiche. Ciascun aplogruppo comprende infatti al suo interno diversi aplotipi, definiti dalle mutazioni che si accumulano sia nelle sequenze codificanti che nella regione di controllo proprie di ciascun individuo, i quali a loro volta sono determinati dalla storia evolutiva della popolazione. A differenza di altri parametri, lo studio degli aplogruppi mitocondriali risente quindi fortemente del tipo di popolazione oggetto dell'analisi, e ciò fa sì che non sempre i dati ottenuti possano essere riproducibili, se pur dotati di un valore scientifico. Ad esempio è interessante sottolineare come uno studio condotto su centenari giapponesi (Tanaka et al., 1998) abbia documentato un'associazione tra il fenotipo longevità e l'aplogruppo M, che è estremamente frequente in Asia ma virtualmente assente nel continente europeo. Analogamente risultati contraddittori sono stati ottenuti all'interno di un medesimo studio di De Benedictis e collaboratori (1999) che andava ad indagare la frequenza degli aplogruppi mitocondriali in soggetti centenari estratti da due diverse aree geografiche, quali Nord Italia e Sud Italia.

Lo studio infatti osservava una frequenza significativamente più alta dell'aplogruppo J nei soggetti reclutati di sesso maschile del Nord Italia rispetto ai controlli, sebbene quest'ultimi appartenessero alla medesima popolazione, ma tale associazione non veniva rilevata nel gruppo proveniente dal Sud Italia.

Sebbene i risultati della presente tesi confermino la mancanza di associazione tra malattia di Alzheimer ed aplogruppi, come già riportato da precedenti studi, e pur nella considerazione sovraesposta circa l'elevata variabilità della frequenza degli aplogruppi mitocondriali negli studi di popolazione, alcune considerazioni vanno comunque fatte nel tentativo di mantenere un ruolo patogenetico del coinvolgimento mitocondriale nella malattia di Alzheimer. Infatti una possibile spiegazione ad un'inapparente attività del ruolo di suscettibilità genetica mitocondriale che si deduce da studi di associazione di polimorfismi o di ricerca di mutazioni potrebbe risiedere nel fatto che alterazioni patogenetiche a livello del mtDNA abbiano un ruolo causativo solo in un ristretto sottogruppo di pazienti o viceversa che solo un piccolo sottogruppo all'interno della popolazione che non sviluppa la malattia di Alzheimer sia portatore di mutazioni in grado di esercitare un effetto protettivo. Risulta inoltre necessario incrementare il numero dei pazienti e dei controlli per poter

conferire maggior valore ai risultati, siano essi positivi che negativi. La ricerca sul peso patogenetico del genoma mitocondriale nella malattia di Alzheimer potrebbe infine beneficiare di studi di comparazione tra pazienti con familiarità positiva per malattia lungo la linea materna e pazienti con familiarità negativa o positiva lungo la linea paterna.

D'altra parte è importante sottolineare come il mancato riscontro fino ad oggi di un ruolo eziopatogenetico maggiore di variazioni polimorfiche o mutazioni puntiformi a carico del mtDNA non contrasti con l'evidenza di una compromissione del metabolismo energetico nella malattia di Alzheimer. Recenti studi hanno infatti dimostrato che il peptide  $\beta$ -amiloide, i cui livelli incrementano tipicamente con la malattia, è capace di esercitare un'azione tossica diretta sui mitocondri e di alterare la funzionalità della catena respiratoria (Casley et al. 2002, Eckert et al., 2003, Anandatheerthavarada et al., 2003; Lustbader et al., 2004). Non si può quindi escludere che il coinvolgimento mitocondriale rientri all'interno di un circolo vizioso in cui l'abnorme funzione mitocondriale consegua ad altre considerazioni patogenetiche.

## **7 TABELLE E FIGURE**

**Tabella 1: classificazione delle demenze**  
(da Loeb e Favale, 2003, modificato)

1a. Demenze primarie

- Malattia di Alzheimer
- Demenza Frontotemporale
- Malattia corpi Lewy

- Uremia
- M Wilson
- Demenza dialitica

1b. Demenza associata a malattie

con degenerazione neuronale primaria

- M Parkinson
- Corea di Huntington
- PSP
- Degenerazione spino-cerebellare
- M Hallervorden-Spatz
- Epilessia Mioclonica progressiva

5. Demenza da idrocefalo normoteso

6. Demenza da malattie carenziali

- S. Korsakoff-Wernicke
- Pellagra
- M Marchiafava-Bignani
- Deficit di Vit.B12 e di folati

2. Demenza vascolare

- Infarti Multipli
- Stato lacunare
- M Binswanger
- Infarti di confine
- Aneurismi e malformazioni A-V
- Anossia ed ipossia

7. Demenza da encefalopatie tossiche e da farmaci

8. Demenza da malattie cerebrali di varia genesi

- Tumori cerebrali
- Traumi cranici
- Infezioni
- Sindromi paraneoplastiche
- Altri disturbi cerebrali

3. Demenze e malattie da prioni

- M Creutzfeldt-Jacob
- Kuru
- M Gerstmann-Straussler-Scheinker

9. Demenza da encefaliti, meningiti, mal.autoimmuni

- Neurosifilide, AIDS, etc

4. Demenze da disturbi endocrino metabolici

- Patologia Tiroidea e Paratiroidea
- Patologia ipopituarica
- Malattie epatiche

10. Demenza da altre malattie

- Sclerosi Multipla, M. di Whipple

## **Tabella 2: criteri clinici NINCDS-ADRDA *Work Group***

### Criteri per la diagnosi di MA probabile

- demenza stabilita con esami clinici e strumentali, documentata da MMSE o test analoghi e confermata da test neuropsicologici
- deficit in due o più aree cognitive
- peggioramento progressivo della memoria e di altre funzioni cognitive
- nessun disturbo di coscienza
- inizio tra i 40 e i 90 anni di età, più frequentemente dopo i 65 anni di età
- assenza di disordini sistemici o di altre malattie del sistema nervoso che possano spiegare i deficit progressivi della memoria e della cognitivtà

### Criteri per la diagnosi di MA possibile

- presenza di una sindrome demenziale, in assenza di altri disordini neurologici, psichiatrici o sistemici in grado di causare demenza e presenza di variazioni dell'esordio, nella presentazione o nel decorso clinico
- presenza di un'altra affezione sistemica o cerebrale che potrebbe causare la demenza ma che non è considerata responsabile della demenza
- presenza di un deficit cognitivo isolato gradatamente progressivo, in assenza di altre cause identificabili

### Criteri per la diagnosi di AD certa

- criteri clinici positivi per la diagnosi di AD probabile
- evidenza istopatologica ottenuta con l'autopsia o la biopsia.

**Tabella 3: siti polimorfici che definiscono gli aplogruppi mitocondriali**

<b>Aplogruppi</b>	<b>1719</b>	<b>4580</b>	<b>7028</b>	<b>8251</b>	<b>9055</b>	<b>10034</b>	<b>10398</b>	<b>12308</b>	<b>13368</b>	<b>13708</b>	<b>16391</b>
H	.....	.....	C	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....
I	A	.....	T	A	.....	C	G	.....	.....	.....	A
J	.....	.....	T	.....	.....	.....	G	.....	.....	A	.....
K	.....	.....	T	.....	A	.....	G	G	.....	.....	.....
T	.....	.....	T	.....	.....	.....	A	.....	A	.....	.....
U	.....	.....	T	.....	.....	.....	A	G	.....	.....	.....
V	.....	A	T	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....
W	.....	.....	T	A	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....
X	A	.....	T	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....

**Tabella 4: primers di DNA per l'analisi degli aplogruppi mitocondriali**

<b>Aplogruppi</b>	<b>Primers (F e R)</b>		<b>Siti polimorfici</b>
1719	1400-1420	2000-1980	-1715 AluI
4580	4308-4325	4739-4720	-4577 NlaIII
7028	6890-6909	7131-7115	-7025 AluI
8251	8188-8207	8376-8345	+8249 AvaII
9055	8829-8845	9184-9163	-9052 HaeII
10034	9911-9932	10107-10088	+10028 AluI
10398	10270-10290	10579-10557	+10397 AluI
12308	12104-12124	12338-12309	+12308 HinfI
13368	13172-13190	13403-13384	+13366 BamHI
13708	13583-13605	13843-13824	-13704 BstNI
16391	16310-16329	16497-16478	+16389 BamHI/MboI

**Tabella 5: frequenza degli aplogruppi nei pazienti e nei controlli**

<b>Aplogruppi</b>	<b>Pazienti (N°210)</b>	<b>Pazienti (%)</b>	<b>Controlli (N°191)</b>	<b>Controlli (%)</b>
H	92	43.8	79	41.4
I	5	2.4	3	1.6
J	17	8.1	14	7.3
K	12	5.7	17	8.9
T	15	7.1	20	10.5
U	29	13.8	24	12.6
V	9	4.3	4	2.1
W	5	2.4	4	2.1
X	9	4.3	5	2.6
ALTRI	17	8.1	21	10.9

**Tabella 6: *ODDS RATIO* degli aplogruppi**

<b>Aplogruppi</b>	<b>OR rispetto ad H (95% CI)</b>
H	
I	1.43 (0.33-6.18)
J	1.04 (0.48-10.62)
K	0.61 (0.27-1.35)
T	0.64 (0.31-1.34)
U	1.04 (0.56-1.93)
V	1.93 (0.57-6.52)
W	1.07 (0.28-4.14)
X	1.55 (0.50-4.80)

**Tabella 7: frequenza degli aplogruppi nei pazienti portatori dell'allele  $\epsilon 4$  e nei pazienti non portatori dell'allele  $\epsilon 4$**

Aplogruppi	Portatori $\epsilon 4$ (%)	Non Portatori $\epsilon 4$ (%)	OR rispetto ad H (95% CI)
H	47	50.5	
I	3	1.5	3.45 (0.30-39.71)
J	13	8	1.72 (0.58-5.08)
K	5	5	1.03 (0.23-4.65)
T	9	6	1.72 (0.51-5.84)
U	11	18	0.67 (0.25-1.80)
V	1.5	5	0.34 (0.04-3.10)
W	1.5	3.5	0.57 (0.06-5.78)
X	8	3.5	2.87 (0.64-12.91)

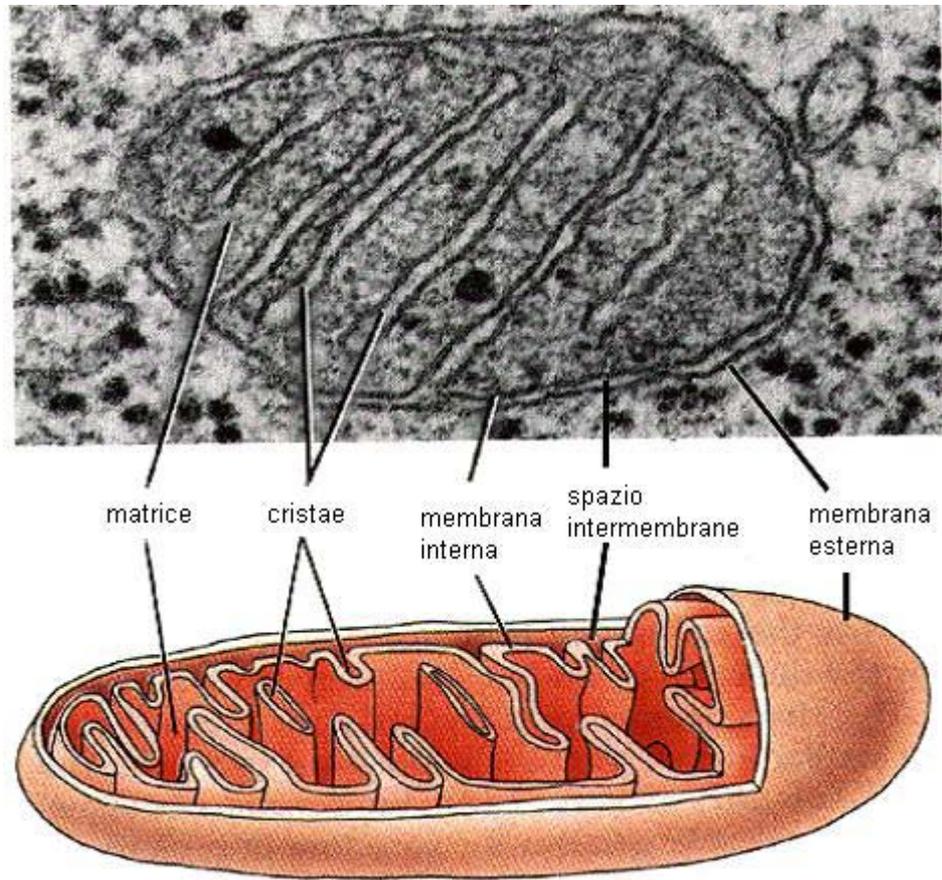
**Tabella 8(a): confronto dei dati ottenuti con i risultati di precedenti studi**

Aplogruppi	Dati presente tesi		Chinnery et al., 2000		Carrieri et al., 2001		Elson et al., 2006	
	Pz (%)	Contr (%)	Pz (%)	Contr (%)	Pz (%)	Contr (%)	Pz (%)	Contr (%)
H	43.8	41.4	47.6	41.3	43.2	34.1	H+V50.0	H+V50.0
I	2.4	1.6	1.6	1.7	n.i.	n.i.	2.0	2.0
J	8.1	7.3	9.2	14	8.5	7.8	10.0	12.0
K	5.7	8.9	11.4	11.7	5.6	9.5	11.0	11.0
T	7,1	10.5	8.6	10.1	15.5	11.7	8.0	9.0
U	13.8	12.6	18.4	17.9	11.3	11.2	16.0	15.0
V	4,3	2.1	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	vedi H	vedi H
W	2.4	2.1	1.6	0.6	n.i.	n.i.	2.0	0.0
X	4.3	2.6	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	0.0	0.0
Altri	8,1	10.9	1.6	2.8	16.0	25.7	2.2	2.2

**Tabella 8(b): confronto dei dati ottenuti con i risultati di precedenti studi**

Aplogruppi	Dati presente tesi		Van der Walt et al., 2004			
	OR	95% IC	Maschi		Femmine	
	OR	95% IC	OR	95% IC	OR	95% IC
I	1.43	0.33-6.18	0.39	0.10-1.58	0.43	0.14-1.39
J	1.04	0.48-10.62	0.84	0.41-1.71	0.85	0.42-1.70
K	0.61	0.27-1.35	0.66	0.30-1.47	0.53	0.25-1.12
T	0.64	0.31-1.34	0.99	0.46-2.14	0.70	0.35-1.43
U	1.44	0.56-1.93	2.30	1.03-5.13	0.44	0.24-0.80
V	1.93	0.57-6.52	0.68	0.20-2.30	0.90	0.23-3.57
W	1.07	0.28-4.14	2.40	0.47-12.18	1.53	0.22-10.56
X	1.55	0.50-4.80	0.61	0.13-2.91	1.29	0.17-9.50

**Figura 1: il mitocondrio**



**Figura 2: processi metabolici mitocondriali**

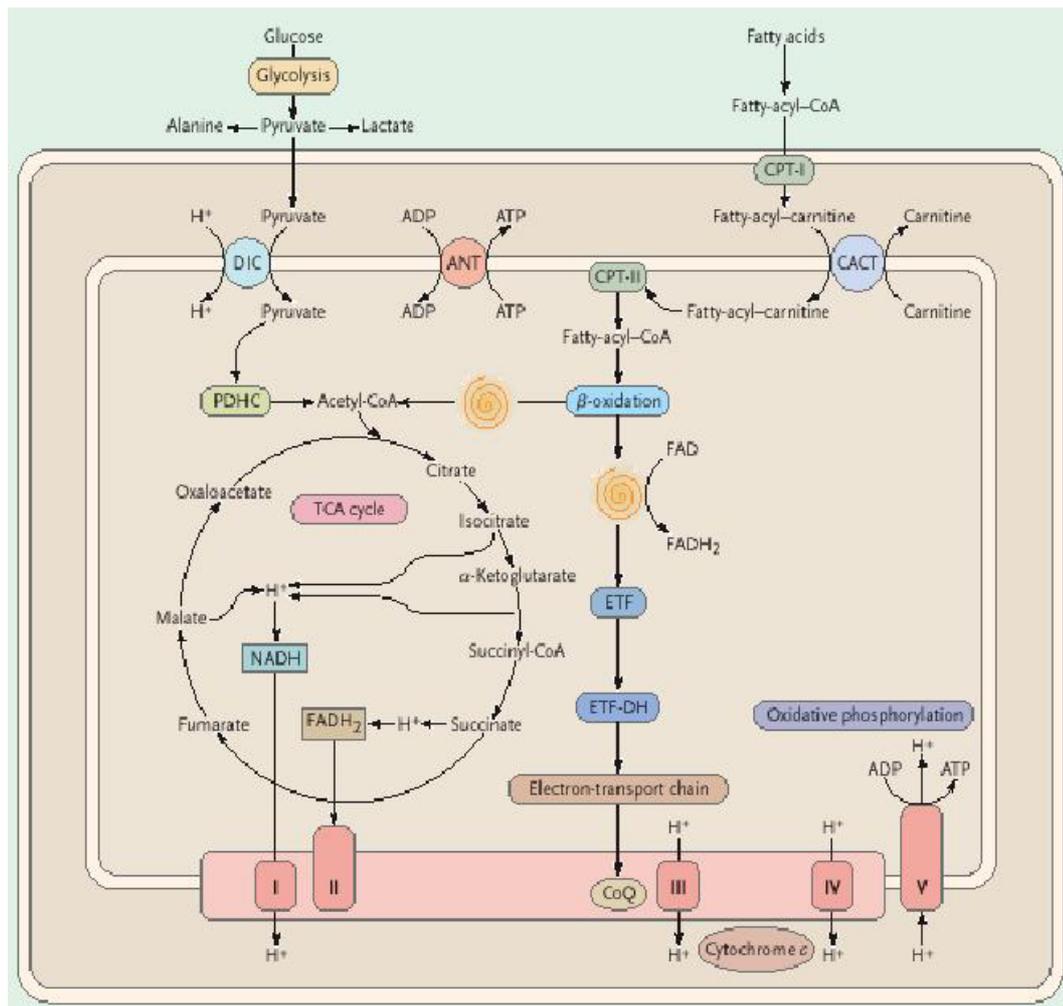
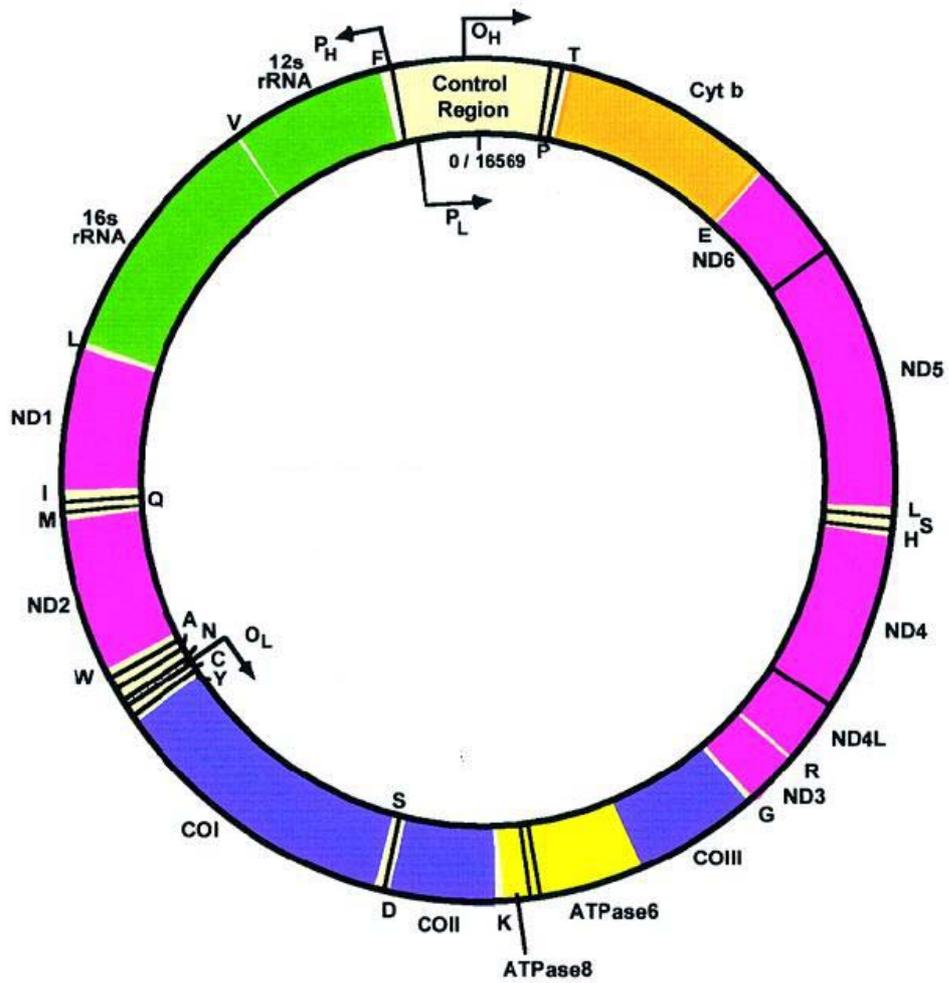
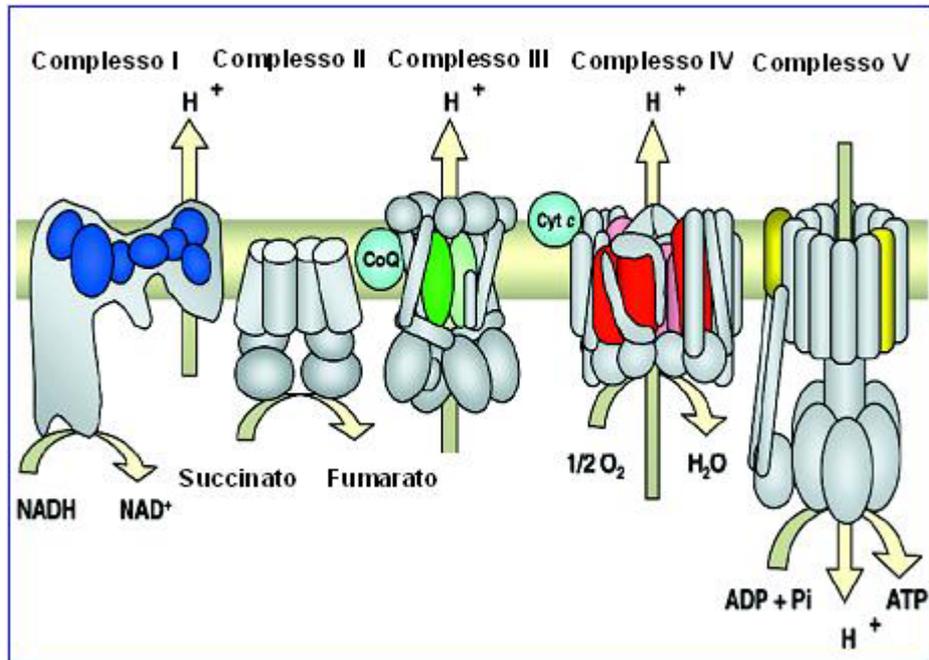


Figura 3: il DNA mitocondriale

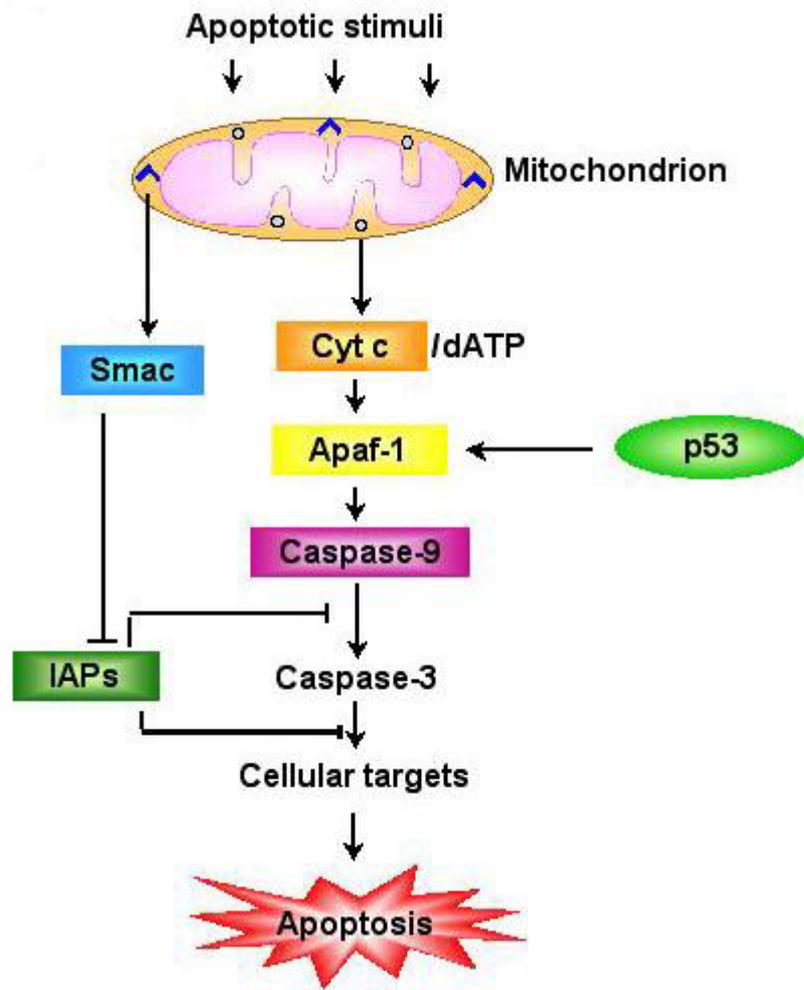


**Figura 4: la catena respiratoria**

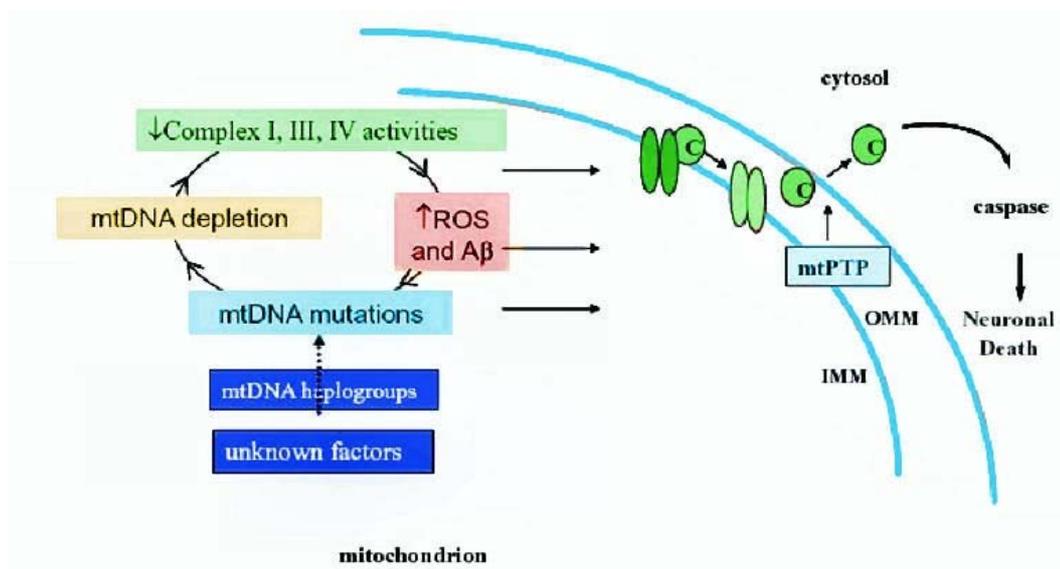


	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
mtDNA	7	0	1	3	2
nDNA	39	4	10	10	14

**Figura 5: l'apoptosi**



**Figura 6: ipotesi della cascata mitocondriale nella patogenesi della malattia di Alzheimer**



## **8 RINGRAZIAMENTI**

Desidero rivolgere i miei più sentiti ringraziamenti a tutti coloro che mi hanno permesso di raggiungere questo importante traguardo.

Ringrazio il Prof. Gabriele Siciliano, relatore della presente tesi, per la disponibilità dimostrata sempre nei miei confronti.

Un grazie di cuore al Dott. Michelangelo Mancuso, alla Dott.ssa Laura Manca, alla Dott.ssa Claudia Nesti, alla Dott.ssa Lucia Petrozzi e alla Dott.ssa Anna Rocchi, che mi hanno aiutata con professionalità e pazienza.

Ringrazio anche il Dott. Fabio Coppedè ed il Dott. Dario Micheli, così come la Dott.ssa Cecilia Carlesi, la Dott.ssa Selina Piazza e la Dott.ssa Leda Volpi per i loro preziosi consigli.

Rivolgo infine un ringraziamento speciale a Fabio e ai miei genitori, che mi sono stati vicini e mi hanno sempre incoraggiata nei momenti di difficoltà.

## 9 BIBLIOGRAFIA

Agarwal S., Sohal R.S. *Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging*. Mech Ageing Dev. 1995; 85(1):55-63.

Anandatheerthavarada H.K., Biswas G., Robin M.A., Avadhani N.G. *Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells*. J Cell Biol. 2003; 161(1):41-54.

Andrews R.H., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N. *Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA*. Nat Genet. 1999; 23(2):147.

Bachurin S.O., Shevtsova E.P., Kireeva E.G., Oxenkrug G.F., Sablin S.O. *Mitochondria as a target for neurotoxins and neuroprotective agents*. Ann N Y Acad Sci. 2003; 993:334-344.

Bandy B., Davison A.J. *Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging?* Free Radic Biol Med. 1990; 8(6):523-539.

Beal M.F. *Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. Neurobiol Aging. 2005; 26(5):585-586.

Beal M.F. *Oxidatively modified proteins in aging and disease*. Free Radic Biol Med. 2002; 32(9): 797-803.

Beck J.A., Janssen J.C., Campbell T.A., Dickinson A., Fox N.C., Harvey R.J., Houlden H., Rossor M.N., Collinge J. *Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families*. Neurology 2003; 60(2):235-239.

Bertram L., Tanzi R.E. *The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients?* Pharmacol Res. 2004; 50(4):385-396.

Blass J.P., Sheu R.K., Gibson G.E. *Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise.* Ann N Y Acad Sci. 2000; 903:204-221.

Blessed G., Tomlinson B.E., Roth M. *The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects.* Br J Psychiatry. 1968; 114(512):797-811.

Bosetti F., Brizzi F., Barogi S., Mancuso M., Siciliano G., Tendi E.A., Murri L., Rapoport S.I., Solaini G. *Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging. 2002; 23(3):371-376.

Boveris A., Cadenas E., Stoppani A.O. *Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide.* Biochem J. 1976; 156(2):435-444.

Bracco L., Amaducci L., Pedone D., Bino G., Lazzaro M.P., Carella F., D'Antona R., Gallato R., Denes G. *Italian Multicentre Study on Dementia (SMID): a neuropsychological test battery for assessing Alzheimer's disease.* J Psychiatr Res. 1990; 24(3):213-226.

Braunwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., Hanser S.L., Longo D.L., Janeson J.L. *Harrison: principi di medicina interna.* McGraw-Hill, 2001.

Brazzelli M., Capitani E., Della Sala S., Spinnler H., Zuffi M. *A neuropsychological instrument adding to the description of patients with suspected cortical dementia: the Milan overall dementia assessment.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994; 57(12):1510-1517.

Brown W.M. *Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77(6):3605-3609.

Bubber P., Harautunian V., Fisch G., Blass J.P., Gibson G.E. *Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications*. Ann Neurol. 2005; 57(5):695-703.

Butterworth R.F., Besnard A.M. *Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease*. Metab Brain Dis. 1990; 5(4):179-184.

Campion D., Dumanchin C., Hannequin D., Dubois B., Belliard S., Puel M., Thomas-Anterion C., Michon A., Martin C., Charbonnier F., Raux G., Camuzat A., Penet C., Mesnage V., Martinez M., Clerget-Darpoux F., Brice A., Frebourg T. *Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum*. Am J Hum Genet. September 1999; 65(3): 664–670.

Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C. *Mitochondrial DNA and human evolution*. Nature. 1987; 325(6099):31-36.

Cardoso S.M., Proenca M.T., Santos S., Santana I., Oliviera C.R. *Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets*. Neurobiol Aging. 2004; 25(1):105-110.

Carrieri G., Bonafè M., De Luca M., Rose G., Varcasia O., Bruni A., Maletta R., Nacmias B., Sorbi S., Corsonello F., Feraco E., Andreev K.F., Yashin A.I., Franceschi C., De Benedictis G. *Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease*. Hum Genet. 2001; 108(3):194-198.

Casley C.S., Land J.M., Sharpe M.A., Clark J.B., duchen M.R., Canevari L. *Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons*. Neurobiol Dis. 2002; 10(3):258-267.

Cassarino D.S., Bennett J.P. Jr. *An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration*. Brain Res Brain Res Rev. 1999; 29(1):1-25.

Castellani R., Hirai K., Aliev G. et al. *Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease*. J Neurosci Res. 2002; 70(3):357-360.

Cernak I., Savic V.J., Kotur J., Prokic V., Veljiovic M., Grbovic D. *Characterization of plasma magnesium concentration and oxidative stress following graded traumatic brain injury in humans*. J Neurotrauma. 2000; 17:53-68.

Chinnery P.F., Taylor G.A., Howell N., Andrews R.M., Morris C.M., Taylor R.W., McKeith I.G., Perry R.H., Edwardson J.A., Turnbull D.M. *Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to AD and dementia with Lewy bodies*. Neurology. 2000;55(2):302-304.

Chinnery P.F., Taylor G.A., Howell N., Brown D.T., Parsons T.J., Turnbull D.M. *Point mutations of the mtDNA control region in normal and neurodegenerative human brains*. Am J Hum Genet. 2001; 68(2):529-532.

Choi J., Malakowsky C.A., Talent J.M., Conrad C.C., Gracy R.W. *Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease*. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 293(5):1566-1570.

Chong Z.Z., Li F., Maiese K. *Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease*. Prog Neurobiol. 2005; 75(3):207-246.

Christen Y. *Oxidative stress and Alzheimer disease and Alzheimer disease*. Am J Clin Nutr. 2000; 71(2):621S-629S.

Conrad C.C., Marshall P.L., Talent J.M., Malakowsky C.A., Choi J., Gracy R.W. *Oxidized proteins in Alzheimer's plasma*. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 275(2):678-681.

Corbo R.M., Scacchi R. *Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE\*4 a 'thrifty' allele?* Ann Hum Genet. 1999; 63 ( Pt 4):301-310.

Corral-Debrinski M., Horton T., Lott M.T., Shoffner J.M., McKee A.C., Beal M.F., Graham B.H., Wallace D.C. *Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains*. Genomics. 1994; 23(2):471-476.

Cortopassi G., Wang E. *Modelling the effects of age-related mtDNA mutation accumulation; complex I deficiency, superoxide and cell death*. Biochim Biophys Acta. 1995; 1271(1):171-176.

Coskun P.E. Beal M.F., Wallace D.C. *Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication*. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(29):10726-10731.

Cotran R.S., Kumar V., Collins T. *Le basi patologiche delle malattie*. Piccin Ed VI, 2000.

Cottrell D.A., Blakely E.L., Johnson M.A. et al. *Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD*. Neurology. 2001; 57(2):260-264.

Cracowski J.L., Durand T., Bessard G. *Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications.* Trends Pharmacol Sci. 2002; 23(8):360-366.

Cutter W.J., Norbury R., Murphy D.G. *Oestrogen, brain function, and neuropsychiatric disorders.* J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003; 74(7):837-840.

De Benedictis G., Rose G., Corrieri G., De Luca M., Falcone E., Passarino G., Bonafe M., Monti D., Baggio G., Bertolini S., Mari D., Mattace R., Franceschi C. *Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans.* FASEB J. 1999; 13(12):1532-1536.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.* Biochem J. 1997; 324(1): 1-18.

Denaro M., Blanc H., Johnson M.J., Chen K.H., Wilmsen F., Cavalli-Sforza L.L., Fallace D.C. *Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1981; 78(9):5768-5772.

DiMauro S., Bonilla E., Mancuso M., Filosto M., Sacconi S., Salviati L., Hirano M. *Mitochondrial Myopathies.* Basic Appl Myol 2003; 13(3):145-153.

DiMauro S., Davidzon G. *Mitochondrial DNA and disease.* Ann Med 2005; 37(3):222-232.

DiMauro S., Mancuso M., Filosto M. *Le malattie mitocondriali.* Neural Sci. 2004; 25:51-52.

DiMauro S., Schon E.A. *Mitochondrial respiratory-chain diseases.* N England J Med 2003; 348(26):2656-2568.

Doll R., Peto R., Boreham J. and Sutherland I. *Smoking and dementia in male British doctors: prospective study*. BMJ. 2000; 320(7242): 1097–1102.

Eckert A., Keil U., Marques C.A., Bonert A., Frey C., Schussel K., Muller W.E. *Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease*. Biochem Pharmacol. 2003; 66(8): 1627-1634.

Elson J.L., Herrnstadt C., Preston G., Thal L., Morris C.M., Edwardson J.A., Flint Beal M., Turnbull D.M., Howell N. *Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease?* Hum Genet. 2006; 119(3):241-254.

Esterbauer H., Cheeseman K.H. *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. Methods Enzymol. 1990; 186:407-421.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med 1991; 11:81-128.

Folstein M.F., Folstein S.E., Mc Hugh P.R. *Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician*. J Psychiatr Res. 1975; 12(3):189-198.

Forbes W.F., Hill G.B. *Is exposure to aluminum a risk factor for the development of Alzheimer disease?* Yes Arch Neurol. 1998; 55(5):740-741.

Foy C.J., Passmore M.D. et al. *Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease*. QJM. 1999; 92(1):39-45.

Fukagawa N.K. *Aging: is oxidative stress a marker or is it causal?* Proc Soc Exp Biol Med. 1999; 222(3):293-298.

Giacchetti M., Monticelli A., De Biase I., Pianese L., Turano M., Filla A., De Michele G., Cocuzza S. *Mitochondrial DNA haplogroups influence the Friedreich's ataxia phenotype*. J Med Genet. 2004; 41(4):293-5.

Gibson G.E., Haroutunian V., Zhang H. et al. *Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype*. Ann Neurol. 2000; 48(3):297-303 (a).

Gibson G.E., Park L.C., Sheu K.F. et al. *The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration*. Neurochem Int. 2000; 36(2):97-112 (b).

Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al. *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature. 1991; 349(6311):704-706.

Graven L., Passarino G., Semino O., Boursot P., Santachiara-Benerecetti S., Langaney A., Excoffer L. *Evolutionary correlation between control region sequence and restriction polymorphisms in the mitochondrial genome of a large Senegalese Mandenka sample*. Mol Biol Evol. 1995; 12(2):334-345.

Halliwell B. *The chemistry of free radicals*. Toxicol Ind Health. 1993; 9(1-2):1-21.

Halliwell B., Chirico S. *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr. 1993; 57(5 Suppl):715S-724S.

Hansson C.A., Frykman S., Farmery M.R., Tjernberg L.O., Nilsberth C., Pursgloves S.E., Ho A., Winblad B., Cowburn R.F., Thyberg j., Ankarcrona M. *Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria*. J Biol Chem. 2004; 279(49):51654-51660.

Harman D. *Free radical theory of aging*. Mutat Res. 1992; 275(3-6):257-266.

Harman D. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol. 1956; 11(3):298-300.

Hendrie H.C, Ogunniyi A., Hall K.S., Baiyewu O., Unverzagt F.W., Gureje O., Gao S., Evans R.M., Ogunseyinde A.O., Adeyinka A.O., Musick B., Hui S.L. *Incidence of dementia and Alzheimer disease in 2 communities: Yoruba residing in Ibadan, Nigeria, and African Americans residing in Indianapolis, Indiana*. JAMA. 2001; 285(6):739-747.

Hensley K., Hall N., Subramaniam R., Cole P., Harris M., Aksenova M, Gabbita S.P., Wu J.F., Carney J.M. *Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation*. J Neurochem 1995; 65: 2146-2156.

Herbert V., Shaw S., Jayatilleke E., Stopler-Kasdan T. *Most free-radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, holoferritin and vitamin C, and inhibited by desferoxamine and apoferritin*. Stem Cells. 1994; 12(3):289-303.

Hixon J.E., Verner D.T. *Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI*. J Lipid Res. 1990; 31(3):545-548.

Howell N., Elson J.L., Chinnery P.F., Turnbull D.M. *mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders*. Trends Genet. 2005; 21(11):583-586.

Howell N., Oostra R.J., Bolhuis P.A., Spruijt L., Clarke L.A., Mackey D.A., Preston G., Herrnsstadt C. *Sequence analysis of the mitochondrial genomes from Dutch pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy*. Am J Hum Genet. 2003; 72(6):1460-1469.

Hy L.X., Keller D.M. *Prevalence of AD among whites: a summary by levels of severity*. Neurology. 2000; 55:198-204.

Ingman M., Kaessmann H., Paabo S., Gyllesten U. *Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans*. Nature. 2000; 408(6813):708-713.

Johnson M.J., Wallace D.C., Ferris S.D., Ratazzi M.C., Cavalli-Sforza L.L. *Radiation of human mitochondria DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns*. J Mol Evol. 1983; 19(3-4):255-271.

Joseph J., Shukitt-Hale B., Denisova N.A., Martin A., Perry G., Smith M.A. *Copernicus revisited: amyloid beta in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 2001; 22(1):131-146.

Kalman B., Li S., Chatterjee D., O'Connor J., Voehl M.R., Brown M.D., Alder H. *Large scale screening of the mitochondrial DNA reveals no pathogenic mutations but a haplotype associated with multiple sclerosis in Caucasians*. Acta Neurol Scand. 1999; 99(1):16-25.

Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Master C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B. *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature. 1987; 325(6106):733-736.

Karp G. *Biologia cellulare e molecolare*. Ed. EdiSES, 2002.

Kawamoto E.M., Munhoz C.D., Glezer I., Bahia V.S., Caramelli P., Nitrini R., Gorjao R., Curi R., Scavone C. Marcourakis T. *Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 2005; 26(6):857-864.

Keller J.N., Launderback C.M., Butterfield D.A., Kindy M.S., Yu J., Markesbery W.R. *Amyloid beta-peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice*. J Neurochem. 2000; 74(4):1579-1586.

Khan S.M., Cassarini D.S., Abramova N.N., Keeney P.M., Borland M.K., Trimmer P.A., Krebs C.T., Bennett J.C., Parks J.K., Swerdlow R.H., Parker W.D. Jr, Bennett J.P. Jr. *Alzheimer's disease cybrids replicate beta-amyloid abnormalities through cell death pathways*. Ann Neurol. 2000; 48(2):148-155.

Kim H.S., Lee J.H., Lee J.P., Kim E.M., Chang K.A., Park C.H., Jeong S.J., Wittendorp M.C., Seo J.H., Choi S.H., Suh Y.H. *Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria*. Neuroreport. 2002; 13(15):1989-1993.

King M.P., Attardi G. *Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation*. Science. 1989; 246(4929):500-503.

Kish S.J., Bergeron C., Rajput A., Dozic S., Mastrogiacono F., Chang L.J., Wilson J.M., Di Stefano L.M., Nobrega J.N. *Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease*. J Neurochem. 1992; 59(2):776-779.

Kleinvelde HA, Swaak AJ, Hach CE, Koster JK. *Interaction between oxygen free radical and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview*. Scandinavian J Rheumatol. 1989; 18:341-352.

Knopman D.S., DeKosky S.T., Cummings J.L., Chui H., Corey-Bloom J., Relkin N., Small G.W., Miller B., Stevens J.C. *Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. Neurology. 2001; 56(9):1143-1153.

Koo E.H., Squazzo S.L. *Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway.* J Biol. Chem. 1994; 269(26):17386-17389.

Kovacs D.M., Fausett H.J., Page K.J., Kim T.W., Moir R.D., Merriam D.E., Hollister R.D., Hallmark O.G., Mancini R., Felsenstein K.H., Hyman B.T., Tanzi R.E., Wasco W. *Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells.* Nat Med. 1996; 2(2):224-229.

Kristal B.S., Yu B.P. *An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions.* J Gerontol. 1992; 47(4):B107-B114.

Lambert J.C., Coyle N., Lendon C. *The allelic modulation of apolipoprotein E expression by oestrogen: potential relevance for Alzheimer's disease.* J Med Genet. 2004; 41:104-112.

Levi-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingel W.H., et al. *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus.* Science. 1995; 269(5226):973-977.

Lezza A.M.S., Mecocci P., Cormio A., Beal M.F., Cherubini A., Cantatore P., Senin U., Gadaleta M.N. *Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients.* FASEB J. 1999; 13(9):1083-1088.

Li F., Calingasan N.Y., Yu F., Mauck W.M., Toidze M., Almeida C.G. et al. *Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice.* J Neurochem. 2004; 89(5):1308-1312.

Lin M.T., Simon D.K., Ahn C.H., Kin L.M., Beal M.F. *High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain*. Hum Mol Genet. 2002; 11(2):133-145.

Loeb C., Favale E. *Neurologia di Fazio Loeb*. Società Editrice Universo, 2003.

Loft S., Poulsen H.E. *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*. J Mol Med. 1996; 74(6):297-312.

Lovell M.A., Ehmann W.D., Mattson M.P., Markesbery W.R. *Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 1997; 18(5):457-461.

Lustbader J.W., Cirilli M., Lin C., Xu H.W., Takuma K., Wang N. et al. *ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease*. Science. 2004; 304(5669):448-452.

Mahley R.W., Rall Jr S.C. *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2000; 1:507-537.

Mancuso M., Conforti F.L., Rocchi A., Tessitore A., Muglia M., Tedeschi G., Panza D., Monsurro M., Sola P., Choub A., Del Corona A., Manca M.L., Mazzei R., Sprovieri T., Filosto M., Salviati A., Valentino P., Bono F., Caracciolo M., Simone I.L., La Bella V., Majorana G., Siciliano G., Murri L., Quattrone A. *Could mitochondrial haplogroups play a role in sporadic amyotrophic lateral sclerosis?* Neurosci Lett. 2004; 371(2-3):158-162.

Mancuso M., Filosto M., Borsetti F., Ceravolo R., Rocchi A., Tognoni G., Manca M.L., Solaini G., Siciliano G., Murri L. *Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease*. Exp Neurol. 2003; 182(2):421-426.

*Manuale diagnostico dei disturbi mentali DSM IV, 1994.*

Marcus D.L., Thomas C., Rodriguez C., Simberkoff K., Tsai J.S., Strafaci J.A., Freedman M.L. *Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease.* Exp Neurol. 1998; 150:40-44.

Markesbery W.R. *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease.* Free Radic Biol Med. 1997; 23(1):134-147.

Mastrogiacoma F., Lindsay J.G., Bettendorff L., Rice J., Kish S.J. *Brain protein and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease.* Ann Neurol. 1996; 39(5):592-598.

Maurer I., Zierz S., Moller H.J. *A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients.* Neurobiol Aging. 2000; 21(3):455-462.

McGrath L.T., McGleenon B.M., Brennon S., McColl D., McILroy S., Passmore A.P. *Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde.* QJM. 2001; 94(9):485-490.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease.* Neurology. 1984; 34(7):939-944.

Mecocci P., Cherubini A., Senin U. *Invecchiamento cerebrale, declino cognitivo, demenza, un continuum?* Critical Medicine Publishing, 2002.

Mecocci P., MacGarvey U., Beal M.F. *Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease.* Ann Neurol. 1994; 36(5):747-751.

Melov S., Schneider J.A., Coskun P.E., Bennett D.A., Wallace D.C. *Mitochondrial DNA rearrangements in aging human brain and in situ PCR of mtDNA*. Neurobiol Aging. 1999; 20(5):565-571.

Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarlato G., Attardi G. *Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication*. Science. 1999; 286(5440):774-779.

Migliore L., Fontana I., Colognato R., Coppedè F., Siciliano G., Murri L. *Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases*. Neurobiol Aging. 2005; 26(5):587-595 (a).

Migliore L., Fontana I., Trippi F., Colognato R., Coppedè F., Tognoni G., Nucciarone B., Siciliano G. *Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients*. Neurobiol Aging. 2005; 26(5):567-573 (b).

Minoshima W.R., Giordani B., Berent S., Frey K.A., Foster N.L., Kuhl D.E. *Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease*. Ann Neurol. 1997; 42(1):85-94.

Miquel J., Economos A.C. et al. *Mitochondrial role in cell aging*. Exp Gerontol. 1980; 15(6):575-591.

Miyata M., Smith J.D. *Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides*. Nat Genet. 1996; 14(1):55-61.

Montine T.J., Beal M.F., Cudkowicz M.E., O'Donnell H., Margolin R.A., McFarland et al. *Increased CSF F2-isoprostane concentration in probable AD*. Neurology. 1999; 52(3):562-565.

Mullan M., Houlden H., Windelspecht M., Fidani L., Lombardi C., Diaz P., et al. *A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene.* Nat Genet. 1992; 2(4):340-342.

Mutisya E.M., Bowling A.C., Beal M.F. *Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease.* J Neurochem. 1994; 63(6):2179-2184.

Nagy Z., Esiri M.M., Le Gris M. et al. *Mitochondrial enzyme expression in the hippocampus in relation to Alzheimer-type pathology.* Acta Neuropathol (Berl). 1999; 97(4):346-354.

Nass M.M., Nass S. *Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments.* J Cell Biol 1969; 19:593-629.

Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C.B., Condrón M.M., Axelman K., Forsell C., Stenlund C., Luthman ., Teplow D.B., Younkin S.G., Näslund J., Lannfelt L. *The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation.* Nat. Neurosci. 2001; 887-893.

Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K. et al. *Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease.* J Neuropathol Exp Neurol. 2001; 60(8):759-767.

Nussbaum R.L., Ellis C.E. *Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease.* N Engl J Med. 2003; 348(14):1356-1364.

Orth M., Schapira A.M. *Mitochondria and degenerative disorders.* Am J Med Genet. 2001; 106(1):27-36.

Parker W.D., Filley C.M., Parks J.K. *Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease*. Neurology. 1990; 40(8):1302-1303.

Pepeu G. *Il passato, il presente e il futuro della ricerca*. L'Alzheimer. 2004; 7-8:14-20.

Petersen R.C., Jack C.R., Xu Y.C., Waring S.C., O'Brien P.C., Smith G.E., Ivnik R.J., Tangalos E.G., Boeve B.F., Kokmen E. *Memory and MRI-based hippocampal volumes in aging and AD*. Neurology 2000; 54(3):581-587.

Pfeiffer E. *A short portable mental status questionnaire for the assessment of organic brain deficit in elderly patients*. J Am Geriatr Soc. 1975; 23(10):433-441.

Polidori M.C. *Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases*. J Postgrad Med. 2003; 49(3):229-235.

Praticò D. *Peripheral biomarkers of oxidative damage in Alzheimer's disease: the road ahead*. Neurobiol Aging. 2005; 26(5):581-583.

Pratico D., Delanty N. *Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease*. Am J Med. 2000; 109(7):577-585.

Reed J.C. *Mechanisms of apoptosis*. Am J Pathol. 2000; 157(5):1415-1430.

Reiter RJ. *Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin*. Neuro Endocrinol Lett. 1999; 20(3-4):145-150.

Richards M., Macaulay V. *The mitochondrial gene tree comes of age*. Am J Hum Genet. 2001; 68(6):1315-1320.

Robert L., Nussbaum M.D., Ellis C.E. *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. N Engl J Med. 2003; 348(14):1356-1364.

Rocchi A., Pellegrini S., Siciliano G., Murri L. *Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease*. Brain Research Bulletin 2003; 61(1):1-24.

Rogaev E.I., Sherrington R., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Lieang Y. et al. *Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene*. Nature. 1995; 376(6543):775-778.

Ruiz-Pesini E., La pena A.C., Diez-Santachez C., Perez-Martos A., Montoya J., Alvarez E., Diaz M., Urries A., Montoro L., Lopez-Perez M.J., Enriquez J.A. *Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility*. Am J Hum Genet. 2000;67(3):682-696.

Ruiz-Pesini E., Mishmar D., Brandon M., Procaccio V., Wallace D.C. *Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA*. Science. 2004; 303(5655):223-226.

Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY pp. 6.4-6.11.

Santachiara-Benerecetti A.S., Scozzari R., Semino O., Torroni A., Brega A., Wallace D.C. *Mitochondrial DNA polymorphisms in Italy. II. Molecular analysis of new and rare morphs from Sardinia and Rome*. Ann Hum Genet. 1988; 52 (Pt 1):39-56.

Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D. et al. *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease*. Neurology. 1993; 43(8):1467-1472.

Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., George-Hyslop P.H., Pericak-Vance M.A., Joo S.H. et al. *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with*

*late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease*. Neurology. 1993; 43(8):1467-1472.

Schellenberg G.D., Bird T.D., Wijsman E.M., Orr H.T., Anderson L., Nemens E., et al. *Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14*. Science. 1992; 258(5082):668-671.

Scozzari R., Torroni A., Semino A., Sirugo G., Brega A., Santachiara-Benerecetti A.S. *Genetic studies on the Senegal population. I. Mitochondrial DNA polymorphisms*. Am J Hum Genet. 1988; 43(4):534-544.

Selkoe D.J. *Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein*. Annu. Rev. Neurosci. 1994; 17:489-517.

Selkoe D.J. *The pathophysiology of Alzheimer's disease*. In: *Early diagnosis of Alzheimer's disease*. Scinto FM, Daffner KR (eds). Humana Press, Totowa NJ, 2000.

Selley M.L., Close D.R., Stern S.E. *The effect of increased concentrations of homocysteine on the concentration of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 2002; 23(3):383-388.

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., et al. *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*. Nature. 1995; 375(6534):754-760.

Sherwin B.B. *Estrogen and cognitive functioning in women*. Endocr Rev. 2003; 24(2):133-151.

Shin W.S., Tanaka M., Suzuki J., Hemmi C., Toyo-oka T. *A novel homoplasmic mutation in mtDNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy.* Am J Hum Genet. 2000; 67(6):1617-1620.

Siciliano G., Rossi B., Manca L., Angelini C., Tessa A., Vergani L., Martinuzzi A., Muratorio A. *Residual muscle cytochrome c oxidase activity accounts for submaximal exercise lactate threshold in chronic progressive external ophthalmoplegia.* Muscle Nerve. 1996; 19(3):342-349.

Simonian S.A., Hyman B.T. *Functional alterations in Alzheimer's disease: selective loss of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase mRNA in the hippocampal formation.* J Neuropathol Exp Neurol. 1994; 53(5):508-512.

Small G.W., Mazziotta J.C., Collins M.T., Baxter L.R., Phelps M.E., Mandelkern M.A., Kaplan A., La Rue A., Adamson C.F., Chang L. *Apolipoprotein E type 4 allele and cerebral glucose metabolism in relatives at risk for familial Alzheimer disease.* JAMA. 1995; 273(12):942-947.

Smith M.A., Hirai K., Hsiao K., Pappolla M.A., Harris P.L., Siedlak S.L., Tabaton M., Perry G. *Amyloid- $\beta$  Deposition in Alzheimer Transgenic Mice Is Associated with Oxidative Stress.* J Neurochem. 1998; 70(5):2212-2215.

Smith M.A., Nunomura A., Lee H.G., Zhu H., Moreira P.I., Avila J., Perry G. *Chronological primacy of oxidative stress in Alzheimer disease.* Neurobiol Aging. 2005; 26(5):579-580.

Smith M.A., Taneda S., Richey P.L., Miyata S., Yan S.D., Stern D., Sayre L.M., Monnier V.M., Perry G. *Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology.* Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(12): 5710–5714.

Sohal R.S., Sohal B.H. *Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging*. Mech Ageing Dev. 1991; 57(2):187-202.

Sorbi S., Bird E.D., Blass J.P. *Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain*. Ann Neurol. 1983; 13(1):72-78.

St George-Hyslop P., Haines J., Rogaev E., Mortilla M., Vaula G., Pericak-Vance M., et al. *Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14*. Nat Genet. 1992; 2(4):330-334.

Stahl W., Sies H. *Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids*. Diabetes. 1997; 46 Suppl 2:S14-S18.

Subramaniam R., Koppal T., Green M., Yatin S., Jordan B., Drake J., Butterfield D.A. *The free radical antioxidant vitamin E protects cortical synaptosomal membranes from amyloid beta-peptide(25-35) toxicity but not from hydroxynonenal toxicity: relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's disease*. Neurochem Res. 1998; 23(11):1403-1410.

Sutovsky P., moreno R.D., Ramalo-Santos J., Dominiko T., Simerly C., Schatten G. *Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos*. Biol Reprod. 2000; 63(2):582-590.

Swerdlow R.H., Khan S.M. *A mitochondrial cascade hypothesis for sporadic Alzheimer's disease*. Med Hypotheses. 2004; 63(1):8-20.

Swerdlow R.H., Parks J.K., Cassarini D.S., Maguire D.J., Maguire R.S., Bennett J.P. Jr, Davis R.E., Parker W.D. Jr. *Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease?* Neurology. 1997; 49(4):918-925.

Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Yoneda M., Yagi K. *Mitochondrial genotype associated with longevity*. Lancet. 1998; 351(9097):185-186.

Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A., St George-Hyslop P., Van Keuren M.L., et al. *Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus*. Science. 1987; 235(4791):880-884.

Thiffault C., Bennett J.P. Jr. *Cyclical mitochondrial deltaPsi fluctuations linked to electron transport, F0F1 ATP-synthase and mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange are reduced in Alzheimer's disease cybrids*. Mitochondrion. 2005; 5(2):109-119.

Torroni A., Huoponen K., Francalacci P., Petrozzi M., Morelli L., Scozzari R., Obinu D., Savontaus M.L., Fallace D.C. *Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations*. Genetics. 1996;144(4):1835-1850.

Torroni A., Schurr T.G., Cabell M.F., Brown M.D., Neel J.V., Larsen M., Smith D.G., Vullo C.M., Wallace D.C. *Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs*. Am J Hum Genet. 1993; 53(3):563-590.

Trimmer P.A., Keeney P.M., Borland M.K., Simon F.A., Almeida J., Swerdlow R.H., Parks J.P., Parker W.D. Jr, Bennett J.P. Jr. *Mitochondrial abnormalities in cybrid cell models of sporadic Alzheimer's disease worsen with passage in culture*. Neurobiol Dis. 2004; 15(1):29-39.

Tuppo E.E., Forman L.J., Spur B.W., Chan-Ting R.E., Chopra A., Cavalieri T.A. *Sign of lipid peroxidation as measured in the urine of patients with probable Alzheimer's disease*. Brain Res Bull. 2001; 54(5):565-568.

Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. *Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria*. Arch Biochem Biophys. 1985; 237(2):408-414.

Utermann G., Pruin N., Steinmetz A. *Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man.* Clin Genet. 1979; 15(1):63-72.

Van der Walt J.M., Dementieva Y.A., Martin E.R., Scott W.K., Nicodemus K.K., Kroner C.C., Welsh-Bohmer K.A., Saunders A.M., Roses A.D., Small G.W., Schmechel D.E., Doraiswamy P.M., Gilbert J.R., Haines J.L., Vance J.M., Pericak-Vance M.A. *Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk.* Neurosci Lett. 2004;15;365(1):28-32.

Van der Walt J.M., Nicodemus K.K., Martin E.R., Scott W.K., Nance M.A., Watts R.L., Hubble J.P., Haines H.L., Koller W.C., Lyons K., Pahwa R., Stern M.B., Colcher A., Hiner B.C., Jankovic J., Ondo W.G., Allen F.H. Jr, Goetz C.G., Small G.W., Mastaglia F., Stajich J.M., McLaurin A.C., Middleton L.T., Scott B.L., Schmechel D.E., Pericak-Vance M.A., Vance J.M. *Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease.* Am J Hum Genet. 2003; 72(4):804-811.

Van Duijn C.H., Clayton D.G., Chandra V., Fratiglioni L., Graves A.B., Heyman A., Jorm A.F., Kokmen E., Kondo K., Mortimer J.A. et al. *Familial aggregation of Alzheimer's disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies.* Int J Epidemiol. 1991; 20 Suppl 2:S13-S20.

Vance J.E., Campenot R.B., Vance D.E. *The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration.* Biochim Biophys Acta. 2000; 1486(1):84-96.

Van der Borgh T., Minoshima S., Giordani B., Foster N.L., Frey K.A., Berent S., Albin R.L., Koeppe R.A., Kuhl J.N. *Cerebral metabolic differences in Parkinson's and Alzheimer's diseases matched for dementia severity.* J Nucl Med. 1997; 38(5):797-802.

Waddington E., Croft K., Clarnette R., Artins R. *Plasma Fz-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease: evidence of increased oxidative stress in vivo.* Alzheimer's Rep. 1999; 2:227-282.

Wallace D.C., Lott M.T., Brown M.D. *Mitochondrial defects in neurodegenerative diseases and aging in: M.F. Beal, N. Howell Eds, Mitochondria and Free radicals In Neurodegenerative diseases.* Wiley-Liss, New York, 1997, pp. 283-307.

Wang H., Shu L., Xie J., Zhang H., Zhang D. *Diagnostic utility of neuropsychological performance and quantitative MRI-based measurement in Alzheimer disease.* Alzheimer Dis Assoc Disord. 2004; 18(3):163-170.

Wei Y.A., Kao S.H., Lee H.C. *Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletions and lipid peroxidation in human aging.* Annals New York Acad. Sci. 1996; 786:24-43.

Zannis V.I., Just P.W., Breslow J.L. *Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined.* Am J Hum Genet. 1981; 33(1):11-24.

Zhang J., Asin-Cayuela J., Fish J., Michikawa Y., Bonafe M., Olivieri F., Passarino G., De Benedictis G., Franceschi G., Attardi G. *Strikingly higher frequency in centenarians and twins of mtDNA mutation causing remodeling of replication origin in leukocytes.* Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(3):1116-1121.

Zhu X., Raine A.K., Perry G., Smith M.A. *Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis.* Lancet Neurol. 2004; 3(4):219-226.

Zhu X., Smith M.A., Perry G., Aliev G. *Mitochondrial failures in Alzheimer's disease*. American Journal of Alzheimer's disease and other dementions vol. 19, number 6, 2004.