





**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
NEUROSCIENZE

XXI CICLO

*Identificazione di un frammento N-terminale della proteina tau  
generato dal taglio delle caspasi apoptotiche in  
modelli cellulari ed animali del morbo di Alzheimer*

*Veronica Corsetti*

A.A. 2007/2008

Docente Guida/Tutor: Prof. Pietro Calissano/ Dr.ssa Giuseppina Amadoro

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

# Indice

<i>Indice</i>	3
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>ABSTRACT</b>	7
<i>Abbreviazioni</i>	8
<i>La demenza senile di Alzheimer</i>	9
<i>La proteina TAU</i>	18
<i>Le funzioni biologiche delle proteine Tau</i>	20
Il dominio amino-terminale	20
Il dominio carbossi-terminale	21
<i>La proteolisi di tau</i>	23
<i>Il ruolo dei mitocondri nel morbo di Alzheimer</i>	24
<i>Modelli utili allo studio del morbo di Alzheimer</i>	27
<i>Modelli cellulari</i>	27
<i>Il modello animale AD11</i>	29
<b>MATERIALI E METODI</b>	31
<i>Materiali</i>	31
<i>Colture cellulari e trattamenti</i>	32
<i>Allestimento di colture primarie di neuronali</i>	32
<i>Preparazione di omogenati cellulari e mitocondri</i>	33
<i>Misure Polarografiche</i>	34
<i>Misure del carrier ADP/ATP</i>	34
<i>Misura dell'attività dell'ATPasi</i>	35
<i>Induzione di apoptosi</i>	35
<i>Analisi di estratti proteici per Western Blotting</i>	35
<i>Misura della sopravvivenza neuronale</i>	36
<i>Analisi Citofluorimetrica a flusso.</i>	37
<i>Saggio ELISA per valutare la morte cellulare</i>	37
<i>Immunofluorescenza</i>	38
<i>Colorazione dei nuclei cellulari per HOECHST 33258</i>	38
<i>Preparazione di estratti proteici da topi di controllo e topi AD11 transgenici</i>	39
<i>Immunoistochimica</i>	39
<i>Analisi statistica dei dati</i>	40

<b>Risultati</b>	<b>41</b>
<i>Sviluppo di una popolazione neuronale derivante da cellule umane SH-SY5Y mature</i>	41
<i>L'apoptosi indotta dalla staurosporina e' bloccata da un inibitore ad ampio spettro delle caspasi</i>	44
<i>Il frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa e' generato durante apoptosi neuronale</i>	46
<i>Identificazione delle proteasi responsabili della produzione del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa</i>	50
<i>Effetti del frammento NH<sub>2</sub>-26-44 di tau sul metabolismo energetico mitocondriale</i>	55
<b>Discussione</b>	<b>62</b>
<b>Referenze Bibliografiche</b>	<b>68</b>

## **ABSTRACT**

E' stato proposto che le alterazioni biochimiche (fosforilazione e/o proteolisi) delle proteine tau rappresentano uno tra i marcatori piu' precoci del processo neurodegenerativo del morbo di Alzheimer (AD). Tali modificazioni inoltre, diversamente dalle placche di beta amiloide (A $\beta$ ), meglio correlano con il decorso clinico e il progressivo declino cognitivo associato a tale malattia dementigena. E' stato recentemente riportato che un aumento dei livelli di espressione del frammento di tau NH<sub>2</sub> 26-230aa, ottenuto mediante infezione adenovirus-mediata di colture neuronali ippocampali e corticali, evoca un potente effetto neurotossico causato da un' attivazione protratta e sostenuta dei recettori extrasinaptici del glutammato di tipo NMDA (Amadoro et al.,2004; Amadoro et al.,2006). La mia tesi di dottorato e' stata pertanto finalizzata all'identificazione di tale frammento N-terminale di tau in diversi modelli cellulari ed animali di neurodegenerazione apoptotica di tipo AD, utilizzando un anticorpo diretto contro il neo-epitopo mappante nella sequenza NH<sub>2</sub> della proteina tau umana e localizzato "a valle" del sito di taglio della(e) caspasi DRKD<sub>25</sub>-QGGYTMHQDQ. In questo lavoro sperimentale noi riportiamo dati morfologici e biochimichi evidenzianti che un frammento NH<sub>2</sub>-terminale di tau di 20-22 kDa, generato dopo taglio delle caspasi e consistente con le dimensioni del peptide neurotossico NH<sub>2</sub>-26-230aa, e' prodotto *in vitro* sia (i) nella linea umana di neuroblastoma SH-SY5Y, differenziata ed indotta in apoptosi mediante privazione di BDNF o in seguito al trattamento farmacologico con staurosporina (STS) che (ii) nei neuroni ippocampali maturi di ratto esposti al peptide A $\beta$  pre-fibrillare. Inoltre tale frammento di tau, la cui espressione correla con una significativa attivazione delle caspasi apoptotiche, e' rilevato anche *in vivo*, nell'ippocampo dei topi transgenici AD11, un noto modello animale in cui la progressiva neurodegenerazione di tipo AD e' indotta mediante l'espressione di anticorpi intarculari anti-NGF. Infine, mediante saggi *cell-free* sui mitocondri neuronali intatti, noi dimostriamo che il peptide sintetico NH<sub>2</sub> 26-44, la minima regione del frammento N-terminale di tau che sostiene *in vitro* l'effetto neurotossico (Amadoro et al., 2006), significativamente diminuisce lo scambio ADP/ATP mediato dal

traslocatore mitocondriale ANT. Al contrario il peptide non tossico NH<sub>2</sub> 1-25 (Amadoro et al., 2006) non esibisce alcun effetto.

Questi risultati (Corsetti et al., 2008; Atlante et al., 2008) supportano l'ipotesi che un'aberrante attivazione delle caspasi, in seguito a stimoli apoptotici o ad insulti neurodegenerativi, possa produrre uno o più frammenti tossici di tau derivati dal dominio N-terminale, i quali ulteriormente contribuiscono a propagare ed ad aumentare il danno cellulare durante la progressione dell'AD.

## **ABSTRACT**

Biochemical modifications of tau proteins have been proposed to be among the earliest neurobiological changes in Alzheimer's disease (AD) and correlate better with cognitive symptoms than do beta-amyloid plaques. We have recently reported that adenovirus-mediated overexpression of the NH<sub>2</sub> 26-230aa tau fragment evokes a potent NMDA-mediated neurotoxic effect in primary neuronal cultures. In order to assess whether such N-terminal tau fragment(s) are indeed produced during apoptosis or neurodegeneration *in vivo*, we attempted to ascertain their presence in cell and animal models using an anti-tau antibody directed against the N-terminal sequence of human protein located downstream of the caspase(s) cleavage site DRKD<sub>25</sub>-QGGYTMHQDQ. We provide biochemical evidence that a caspase(s)-cleaved NH<sub>2</sub>-terminal tau fragment of 20-22 kDa, consistent with the size of the NH<sub>2</sub> 26-230aa neurotoxic fragment of tau, is generated *in vitro* in differentiated human SH-SY5Y cells undergoing apoptosis by BDNF withdrawal or following treatment with staurosporine. In addition this NH<sub>2</sub>-terminally cleaved tau fragment, whose expression correlates with a significant up-regulation of caspase(s) activity, is also specifically detected *in vivo* in the hippocampus of 15 months old AD11 transgenic mice, a model in which a progressive AD-like neurodegeneration is induced by the expression of transgenic anti NGF antibodies. Having confirmed that adenovirus-mediated overexpression of NH<sub>2</sub>-tau fragment lacking the first 25 aminoacids evokes a potent neurotoxic effect, sustained by protracted stimulation of NMDA receptors, in primary neuronal cultures we investigated whether and how chemically synthesized NH<sub>2</sub>-derived tau peptides, i.e. NH<sub>2</sub>-26–44 and NH<sub>2</sub>-1–25 fragments, affect mitochondrial function. Oxidative phosphorylation is not affected by NH<sub>2</sub>-1–25 tau fragment, but dramatically impaired by NH<sub>2</sub>-26–44 tau fragment. Both cytochrome c oxidase and the adenine nucleotide translocator are targets of NH<sub>2</sub>-26–44 tau fragment, but adenine nucleotide translocator is the unique mitochondrial target responsible for impairment of oxidative phosphorylation by the NH<sub>2</sub>-26–44 tau fragment, which then exerts deleterious effects on cellular availability of ATP synthesized into mitochondria. The results (Corsetti et al., 2008; Atlante et al., 2000) support the idea that aberrant activation of caspase(s), following apoptotic stimuli or neurodegeneration insults, may produce one or more toxic NH<sub>2</sub>-tau fragments, that further contribute to propagate and increase cellular dysfunctions in AD.

## **Abbreviazioni**

STS: staurosporina  
AD: morbo di Alzheimer  
dbAMPc: N6,2'-O-bibutyryladenosine 5'-5'-cyclic  
MDL28170: carbobenzoxy-valinyl-phenylalaninal  
Z-VAD-fmk: Z-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluoromethylketone  
APP: amyloid precursor protein  
NFT: neurofibrillary tangles  
CCP-NH<sub>2</sub>-tau: Caspase-Cleaved-Protein-NH<sub>2</sub>-tau  
AD11: anti-NGF-transgenic mice  
AA:antimicina  
ANT: traslocatore adenin nucleotide  
Ap5A:P<sub>1</sub>P<sub>5</sub>-Di(adenosine-5')penta-phosphate  
ATP D.S.:Sistema di rivelazione dell'ATP  
ATR: atractiloside  
BME: basal medium Eagle  
β-OH: β-idrossibutirrato  
CGC: cerebellar granule cells  
CN<sup>-</sup>: cianidio di potassio  
COX: citocromo ossidasi  
MERS: mersalile  
NMDA: N-methyl-D-aspartate  
OLIGO: oligomicina  
PBS: phosphate buffer saline medium  
RCI: indice di controllo respiratorio  
ROT: rotenone  
SUCC: succinato



## La demenza senile di Alzheimer

Circa cento anni fa, il neurologo tedesco Alois Alzheimer durante il congresso di Tubigen, presento' il caso di Auguste D, una donna 51enne che soffriva di una grave forma di demenza progressiva. Nel 1910 il famoso psichiatra Emil Kraepelin nel suo "Trattato" defini' per la prima volta questa forma di demenza "malattia di Alzheimer"

Il morbo di Alzheimer (AD) e' la piu' comune forma di demenza poiche' si stima che circa il 50-70% della popolazione mondiale soffrono di tale malattia dementigena.

L'AD e' stato definito anche la malattia delle quattro "A" in quanto caratterizzato da :

- i. perdita significativa della memoria (*amnesia*)
- ii. incapacita' di formulare e comprendere i messaggi verbali (*afasia*)
- iii. incapacita' di identificare correttamente gli stimoli, riconoscere persone, cose e luoghi (*agnosia*)
- iv. incapacita' di compiere correttamente alcuni movimenti volontari (*aprassia*)

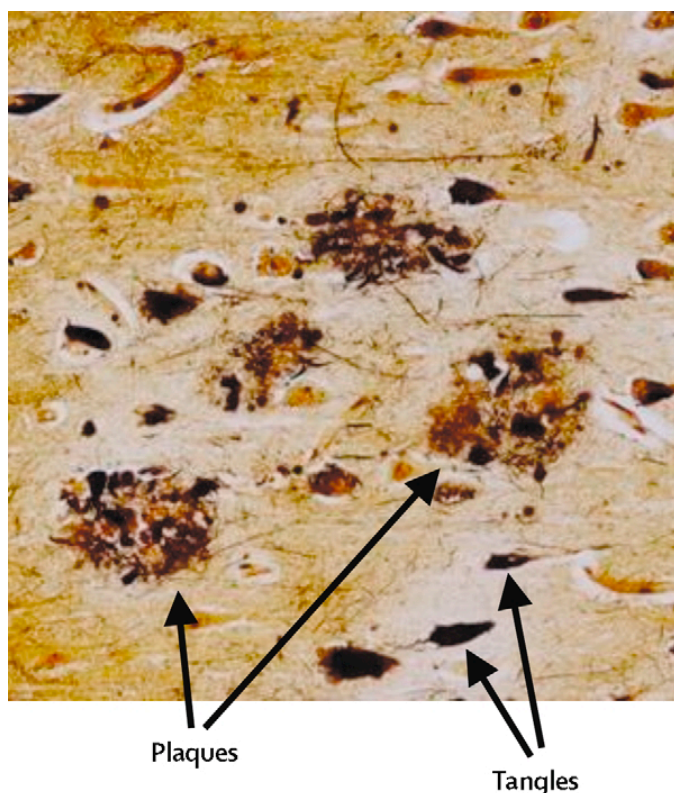
Le evidenze epidemiologiche sull'AD e sulle demenze in generale, mostrano come esse oggi rappresentino uno dei principali problemi della salute dell'uomo. Questa preminenza non si limita solo agli aspetti quantitativi legati all'enorme aumento delle persone affette, ma ha anche rilevanti implicazioni qualitative per l'autonomia funzionale delle persone anziane.

Il principale fattore di rischio di AD e' l'eta': la malattia colpisce una persona su 20 oltre i 65 anni (1 su 100 tra 65 e 74 anni, 1 su 14 tra 75 e 85 anni e 1 su 5 oltre gli 85). Altri fattori di rischio che intervengono nello sviluppo della patologia sono condizioni di malnutrizione, dimensioni ridotte del cranio, traumi cranici pregressi, l'ipertensione, l'ipercolesterolemia, il diabete, il fumo e l'obesita'.

L'AD e' un disordine eterogeneo, con forme sia familiari che sporadiche. I geni coinvolti nelle forme familiari, ereditarie sono localizzati su diversi cromosomi: i) il cromosoma 21 che codifica per il precursore proteico (APP) della proteina beta-amiloide(A $\beta$ ); ii) il cromosoma 14 e il cromosoma 1 che codificano per gli enzimi maturativi di tale oloproteina, noti come presenilina 1 e 2 che caratterizzano rispettivamente le forme ad esordio precoce (35-56 anni) e quelle ad esordio piu' tardivo

(40-90 anni). Nelle forme sporadiche ha un ruolo importante il gene dell'APOE che è localizzato sul cromosoma 19 e presenta tre polimorfismi riferiti a tre diverse isoforme alleliche,  $\epsilon_2, \epsilon_3, \epsilon_4$ . Studi condotti su reperti autoptici hanno evidenziato infatti che la frequenza dell'allele  $\epsilon_4$  varia dal 33 al 40% nei pazienti affetti da AD, mentre nei soggetti sani oscilla fra il 5 e il 14%. Non sono completamente noti i meccanismi attraverso cui l'ereditarietà dell'allele  $\epsilon_4$  dell'APOE aumenta la probabilità di andare incontro ad AD. È noto che nei pazienti affetti da AD, l'APOE è presente in modo elevato e colocalizza nelle placche senili mentre studi *in vitro* hanno dimostrato che l'APOE stimola fortemente la polimerizzazione del peptide A $\beta$  (Holzman et al., 2000).

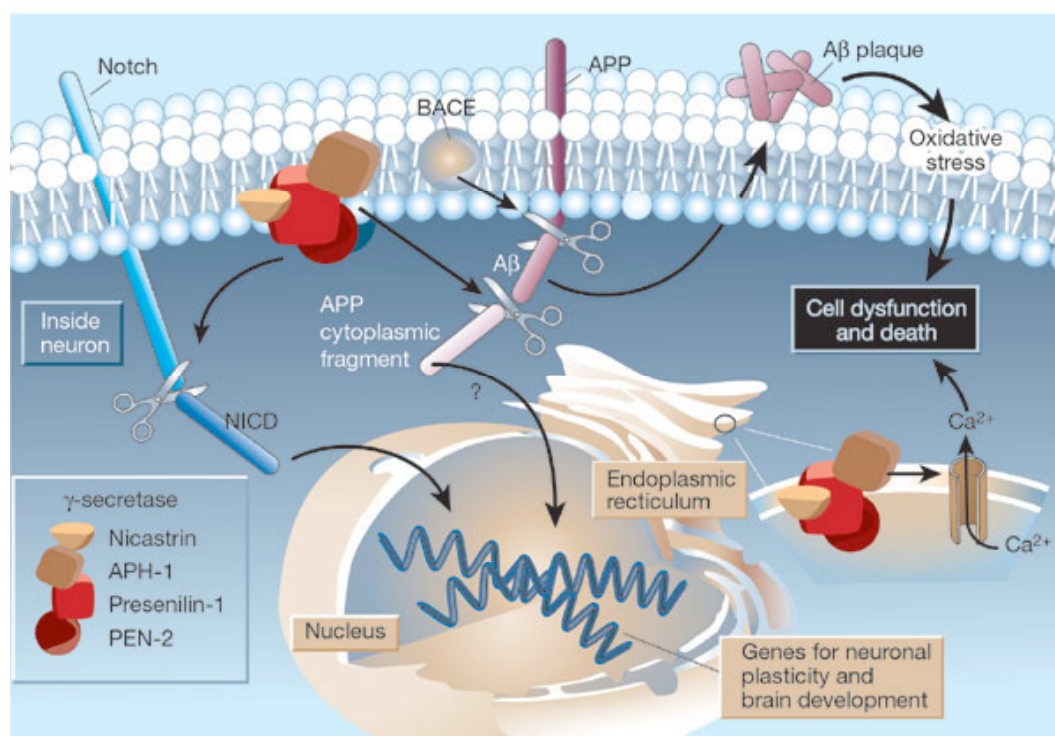
Nei pazienti affetti da AD, è possibile notare, mediante un'analisi neuropatologia macroscopica, una selettiva degenerazione dei neuroni ippocampali e corticali con riduzione del numero delle sinapsi ed una dilatazione dei ventricoli laterali. A livello microscopico, le lesioni caratteristiche dell'AD sono sia le placche senili extracellulari, chimicamente costituita dal peptide neurotossico A $\beta$  che i grovigli neurofibrillari intracellulari, composti dalla proteina tau (fig.1)



**Fig1:** Immagine di corteccia cerebrale di un paziente affetto da AD, in cui sono evidenti le placche senili di beta-amiloide e i grovigli neurofibrillari di tau (Blennow et al., 2005)

La scoperta di una correlazione tra l'abbondanza delle placche e la severità della

demenza pose un grande attenzione sul coinvolgimento delle placche nella patogenesi del morbo (Blessed et al., 1968). A causa della loro insolubilità, il tentativo di identificare la composizione proteica delle placche fu infruttuosa fino alla metà degli anni ottanta, quando alcuni ricercatori identificarono nel “core” il peptide A $\beta$ , che costituisce il maggior componente biochimico delle placche stesse (Masters et al., 1985), decodificandone la completa sequenza aminoacidica. Successivamente si scoprì che l’A $\beta$  è prodotta costitutivamente durante il normale metabolismo cellulare (Haass et al., 1992). Dopo tale scoperta iniziò una intensa ricerca per i due ipotetici enzimi che excidono il peptide A $\beta$  dall’ APP e che furono designati in seguito come  $\beta$ -secretasi e  $\gamma$ -secretasi (fig. 2). La  $\gamma$ -secretasi è un complesso proteico intramembrana, consistente di quattro elementi: presenilina (che costituisce il sito attivo), nicastrina, PEN-2 e APH-1 (Gandy et al., 2005). La maggiore attività della  $\beta$ -secretasi origina da un’aspartil proteasi integrale di membrana chiamata BACE1 (*b-site APP-cleaving enzyme 1*).

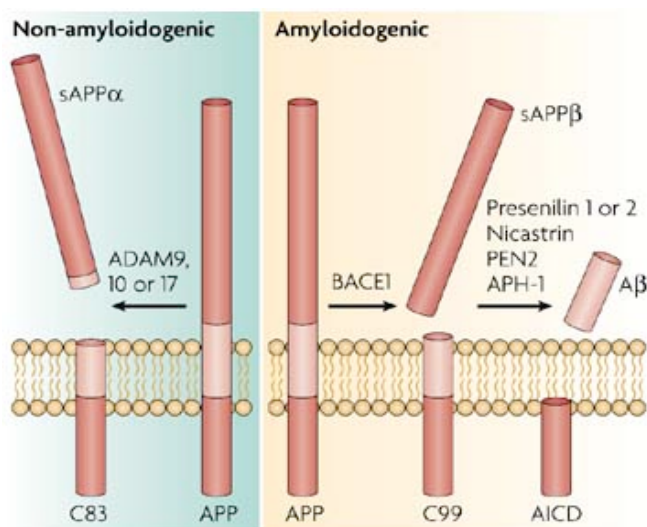


**Fig 2:** Schema della struttura di APP e della sua maturazione proteolitica. Nella figura è schematizzata la struttura della proteina APP. È evidente il piccolo dominio citosolico, un tratto transmembrana, ed una grossa regione extracellulare/intraluminale.

L’oloproteina precursore APP, appartiene alla famiglia di glicoproteine transmembrana di tipo 1 ed è espressa in modo ubiquitario in diversi tipi cellulari. Meta’ della porzione amino terminale dell’APP è proiettata extracellularmente o può essere localizzata nel

lume delle vescicole secretorie, mentre la restante metà o porzione C-terminale è citoplasmatica (fig.3) (Maccioni et al., 2001).

Come ho detto prima, l' APP è substrato di tre differenti attività proteolitiche, denominate originariamente  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  secretasi, in considerazione del fatto che alla loro azione consegue la liberazione di forme secrete di APP (Fig. 3) (Selkoe, 2001). Il taglio dell'  $\alpha$ -secretasi avviene all'interno della sequenza del peptide  $A\beta$ , impedendo in tal modo la generazione del peptide stesso. Per tale motivo la maturazione dell' APP promossa dall'  $\alpha$ -secretasi è stata denominata non-amiloidogena. In seguito al taglio  $\alpha$ -secretasico, avviene il rilascio di un grande frammento ammino-terminale solubile, che include tutto il dominio extracellulare di APP (sAPP $\alpha$ ), ed un corto frammento carbossi-terminale (C83) legato alla membrana, che include tutto il tratto transmembrana ed il corto dominio citosolico. C83 è substrato della  $\gamma$ -secretasi, che genera il peptide p3 (Haass et al., 1993; Haass et al., 1992), non aggregante e non neurotossico, ed un frammento AICD (APP IntraCellular Domain), di 57 residui (DeStrooper and Annaert, 2000; Passer et al., 2000). La forma solubile di sAPP $\alpha$  sembra agire come fattore autocrino (Saitoh et al., 1989), neuroprotettivo e forse anche neurotrofico (Mattson et al., 1993).

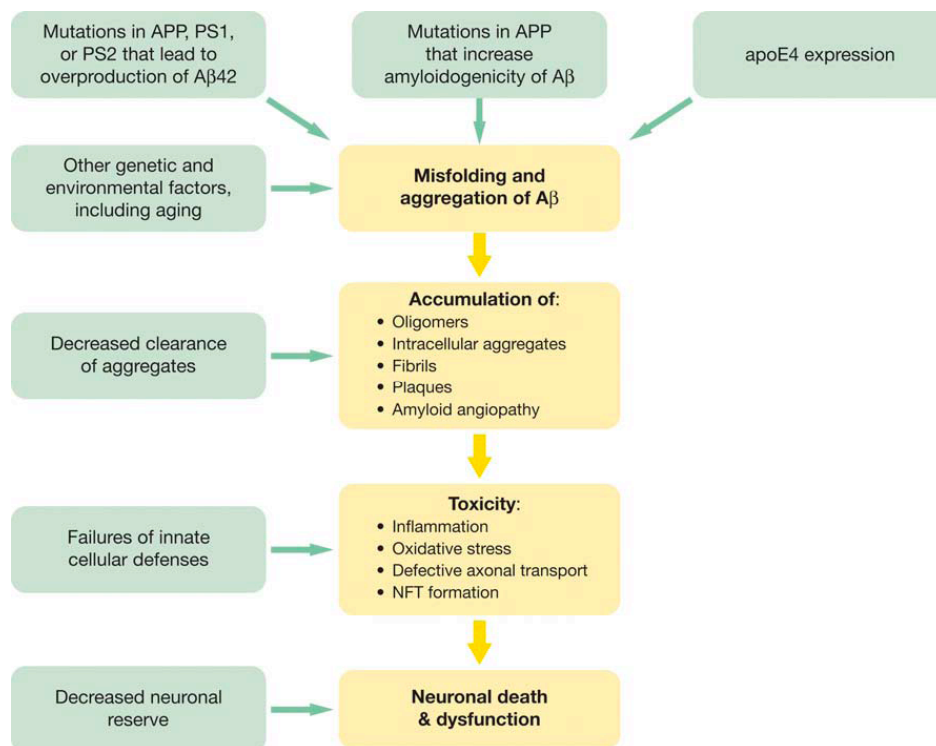


**Fig.3:**Schematizzazione degli eventi proteolitici coinvolti nella maturazione di APP. Processamento non amiloidogenico: il taglio dell' $\alpha$ -secretasi avviene all'interno della sequenza del peptide  $\beta$ -amiloide e rilascia una porzione di APP solubile (sAPP $\alpha$ ) ed un frammento, C83, che diviene substrato di  $\gamma$ -secretasi, generando il frammento p3 ed un corto frammento C-terminale (AICD); Processamento amiloidogenico: l'azione combinata di  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi è, invece, responsabile del rilascio del peptide  $\beta$ -amiloide, di AICD e una porzione di APP solubile (sAPP $\beta$ ) più corta. APP può essere anche substrato di caspasi, dal cui taglio si genera C31

Il pathway amiloidogenico prevede invece che la  $\beta$ -secretasi tagli l' APP all'estremità ammino-terminale del peptide  $A\beta$ , generando una forma solubile di APP più corta (sAPP $\beta$ ) ed un frammento di 99 residui (C99). La  $\gamma$ -secretasi taglia tale frammento determinando la generazione del frammento AICD, che trasloca nel nucleo modulando l'espressione di numerosi geni cellulari (Selkoe et al.,2001) e del peptide  $A\beta$ 40, l'isoforma di  $A\beta$  più abbondante; se il taglio ad opera della  $\gamma$ -secretasi avviene 2aa più a valle, viene prodotto un frammento  $A\beta$  di 42 residui, detto  $A\beta$ 42, altamente fibrillogenico e che rappresenta circa 10% del totale  $A\beta$ .

Negli ultimi anni, sono stati identificati altre modalità di taglio dell' APP: due tagli, detti  *$\gamma$ -secretasi-like* o  $\epsilon/\zeta$ -cleavage, che avvengono 7-10 aa più a valle del sito di taglio della  $\gamma$ -secretasi che produce  $A\beta$ 42 (quindi più prossimi all'interfaccia membrana/citosol) e la cui rilevanza fisiopatologia non è ancora nota. Un altro tipo di taglio avviene invece a livello del sito tra l'Asp664 e Ala665, a valle di quello riconosciuto dalla  $\gamma$ -secretasi, su cui agisce una caspasi (probabilmente caspasi-3): tale taglio porta alla produzione di un peptide di 31 amminoacidi (C31), che è neurotossico per la cellula ed è un potente attivatore apoptotico (Lu et al., 2000; Weidemann et al., 1999).

Il peptide  $A\beta$  1-42, non è solo il costituente biochimico principale delle placche senili, ma gioca anche un importante ruolo nell' eziopatogenesi della malattia. Sulla base dell'ipotesi più accreditata o cascata amiloidogenica (fig.4), l'evento scatenante la patologia sarebbe l' accumulo nel cervello del peptide neurotossico  $A\beta$  conseguente ad uno squilibrio tra la sua produzione e/o rimozione, portando in ultimo alla degenerazione neuronale e alla demenza clinica (Hardy and Selkoe, 2002).



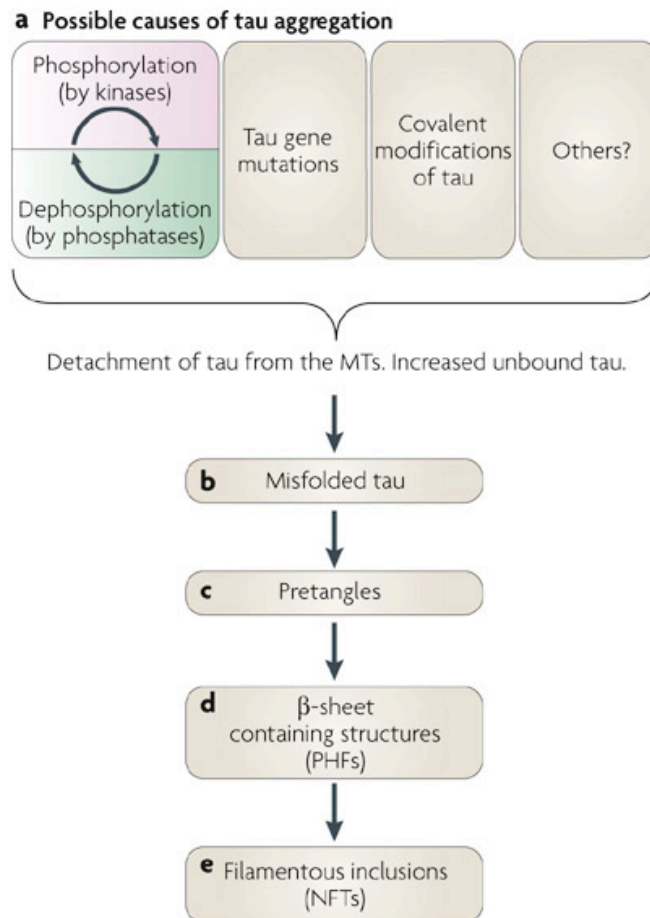
**Fig. 4:** Ipotesi della cascata amiloidea. L'aumento dell'aggregazione di A $\beta$ , che puo' avvenire per diversi motivi (mutazioni del dominio dell'APP, espressione dell'ApoE4, fattori genetici), porta all'accumulo di aggregati in diverse forme e locazioni, che risultano essere tossiche. La diminuita rimozione degli aggregati ed una difesa cellulare inappropriata determinano una tossicita' esacerbata. Gli effetti tossici dell'amiloide portano alla morte ed a disfunzioni che si manifestano come demenze.

Tale ipotesi e' supportata dal riscontro che le mutazioni a carico dell'APP e della presenilina 1 o 2, geneticamente associate a casi familiari di AD, sono le stesse che portano ad un aumento della produzione e/o dell'accumulo di specie A $\beta$ . Inoltre la nozione che le persone affette da sindrome di Down (trisomia del cromosoma 21), che possiedono una terza copia di questo cromosoma, sviluppano placche di A $\beta$  in fasi precoci della loro vita, e la recente scoperta che nei casi familiari di AD esiste una duplicazione del *locus* APP (Rovelet-Lecrux et al., 2006), ulteriormente supportano l'ipotesi eziopatogenetica che alti livelli d'espressione dell'APP causanti l'accumulo di A $\beta$  siano causa della malattia. L' A $\beta$  solubile inoltre subisce una serie di cambiamenti conformazionali (*misfolding*) con acquisizione di una struttura  $\beta$ -sheet che la rendono più prona ad aggregarsi in oligomeri/polimeri insolubili costituenti il *core* delle placche extracellulari (Blennow et al., 2006). Diversamente da quanto si riteneva inizialmente, fu dimostrato che gli oligomeri solubili e diffusibili di A $\beta$ , ma non le placche extracellulari insolubili, sono gli effettivi mediatori e perpetuatori del processo neurodegenerativo. Gli oligomeri

solubili di A $\beta$  sono infatti neurotossici in quanto inibiscono il potenziamento a lungo termine (LTP *Long-Term Potentiation*) alterando la plasticità sinaptica (Blennow et al., 2006), causano disfunzione mitocondriale, stress ossidativo e alterazione dell'omeostasi ionica intracellulare (Reddy et al., 2008), inducono iperfosforilazione di tau, disassemblaggio dei microtubuli con conseguente compromissione del trasporto assonale, provocano infine eventi abortivi del ciclo cellulare (fig.4) (Selkoe et al., 2001).

Quasi in parallelo con l'identificazione di A $\beta$  nelle placche, fu dimostrato che le *tangles* erano costituite da forme tronche ed iperfosforilate della proteina tau. (Blennow et al., 2006).

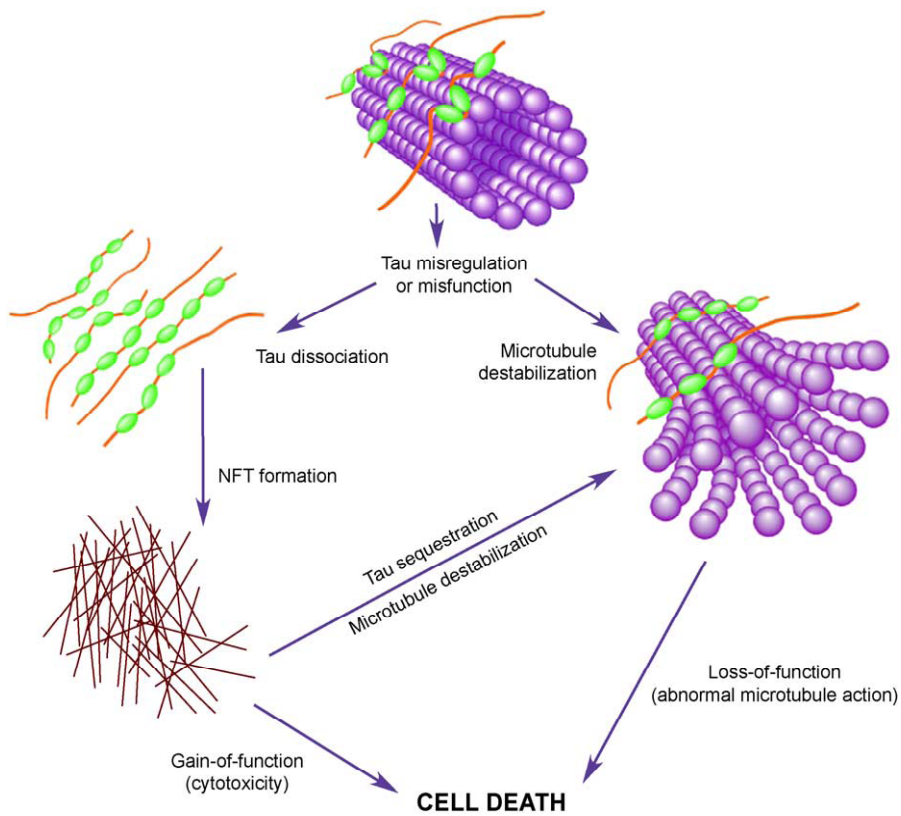
Tau fu in principio scoperta nel 1975 da Weingarten et al. (Weingarten et al. 1975) come una proteina che copurificava con i microtubuli e fu chiamata appunto tau per la sua abilità di indurre "*tubule formation*". L'interesse per tau inizialmente fu solo moderato finché fu dimostrato che tau iperfosforilata costituiva i "Paired Helical Filaments" (PHFs) che rappresentano il core delle "*NeuroFibrillary Tangles*" (NFTs) trovate nell'AD (Kosik et al., 1986; Grundke-Iqbal I. et al., 1986a; Grundke-Iqbal I. et al., 1986b) sollevando un grande ed immediato interesse da parte della comunità scientifica. Tuttavia, è da considerare, che sebbene solo mutazioni nei geni che codificano per l'APP o per gli enzimi maturativi causano forme familiari di AD (Tanzi et al., 1987; St. George-Hyslop et al., 1987) alterazioni genetiche di tau sono esse stesse causa di neurodegenerazione. Mutazioni nel gene codificante per le proteine tau sono infatti geneticamente associate a un raro disordine autosomico dominante, detto demenza frontotemporale FTDP-17, caratterizzato da una atrofia dei lobi temporali con pronunciata patologia di tau ma in totale assenza di patologia amiloidea (Baker et al 1997; Hutton et al. 1998; Spillantini et al. 1998; Poorkaj et al. 1998). Sebbene i livelli di fosforilazione della proteina tau aumentino durante lo sviluppo, nei cervelli AD l'estensione della fosforilazione sito-specifica di tau aumenta di circa quattro volte rispetto ai valori normali. Si ritiene che in normali condizioni fisiologiche, tau sia in costante equilibrio dinamico con i microtubuli e che l'affinità della proteina per i microtubuli sia principalmente controllata dal suo stato di fosforilazione. In condizioni patologiche, l'equilibrio di legame di tau ai microtubuli è perturbato causando un aumento dei livelli citosolici della frazione non-legata della proteina, la quale è così più esposta al taglio proteolitico da parte di diverse proteasi cellulari e/o a profondi cambiamenti conformazionali culminanti in aggregazione e formazione dei grovigli neurofibrillari (fig.5) (Ballatore et al., 2007).



**Fig.5:** Schematizzazione degli eventi che determinano i) il distacco di tau dai microtubuli, ii) i cambiamenti conformazionali la troncazione e la sua aggregazione, iii) la formazione delle tangles neurotossiche.

Le conseguenze patologiche di tale cascata di eventi indurrebbero i) la perdita delle normali funzioni cellulari di tau con conseguente disassemblaggio dei microtubuli, compromissione del trasporto assonale, disfunzione sinaptica e morte neuronale (perdita di funzione o *loss of function*) (fig.6); ii) l'acquisto di nuove funzioni tossiche da parte di forme tronche iperfosforilate della proteina stessa (acquisto di funzione o *gain of function*) (fig.6) che da un lato sequestrano il pool endogeno di tau legato ai microtubuli e dall'altro assemblano in aggregati proteici insolubili che interferiscono stericamente con i normali meccanismi di traffico intracellulare.

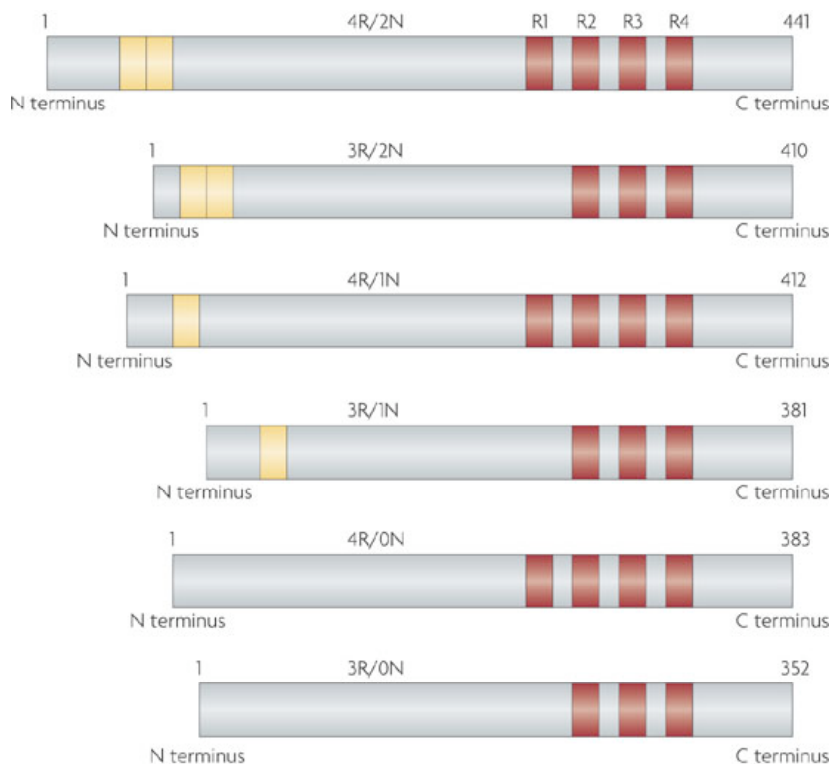




**Fig. 6:** Modello schematico della tossicità di tau, che consiste i) nel perdere le sue normali funzioni di stabilizzare i microtubuli (*loss of function*) e ii) nell' acquisire nuove funzioni tossiche (*gain of function*).

## La proteina TAU

Le proteine tau appartenenti alla famiglia delle proteine associate ai microtubuli (*Microtubule Associated Protein* MAPs) sono fosfoproteine principalmente espresse, anche se non esclusivamente, nei neuroni. Infatti la proteina tau sono trovate nelle cellule gliali, negli oligodendrociti ed anche in molti tessuti periferici come cuore, rene, muscolo, pancreas e fibroblasti (Chun and Johnson., 2007). La funzione principale di tau e' di garantire la corretta citoarchitettura neuronale promuovendo l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli citoscheletrici. Oltre a tale funzione, le proteine tau giocano un ruolo cruciale nel regolare diversi meccanismi, come la crescita neuritica, il trasporto assoplasmatico, la polarità e la forma assonale. Inoltre le proteine tau sono coinvolte in numerose ed importanti vie di transduzione del segnale intracellulare (Johnson and Stoothoff., 2004).



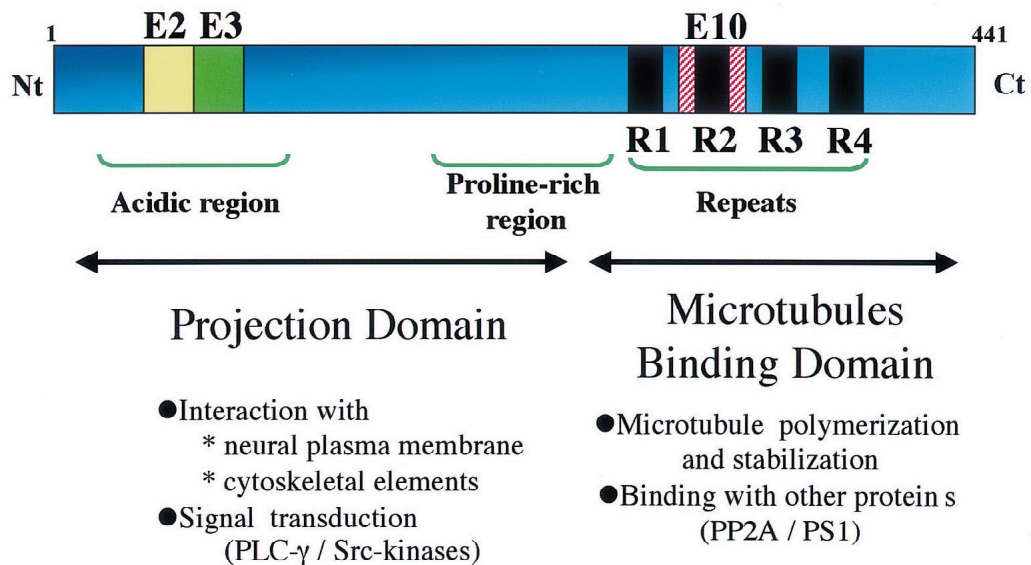
**Fig. 7:** Rappresentazione schematica delle diverse isoforme della tau umana.

Come schematizzato nella fig.7 nel cervello umano adulto sono espresse sei diverse isoforme della proteina tau. Tali varianti originano dallo *splicing* alternativo degli esoni 2, 3 e 10 dell'unico mRNA trascritto da un gene a copia singola sito sul cromosoma 17q21. Tali isoforme variano dai 352 ai 441 aa in lunghezza, con un peso molecolare apparente

compreso tra i 50 e i 70 kDa. Da un punto di vista strutturale, tau e' una proteina modulare in quanto e' caratterizzata :

(i) da una regione acida aminotermineale seguita da una regione basica, più distale e ricca in prolina, che e' normalmente chiamata "dominio di proiezione" in quanto legante la membrana plasmatica (fig.8).

(ii) da un dominio di interazione ai microtubuli, che è costituito da motivi conservati ripetuti di legame alla tubulina e comprende la porzione carbossi-terminale della proteina (fig.8).



**Fig. 8:** Rappresentazione schematica dei domini funzionali dell'isoforma umana più lunga. Il dominio di proiezione, che include una regione acida ed una regione ricca in prolina, interagisce con i componenti del citoscheletro per determinare lo spazio tra i microtubuli negli assoni. La porzione N-terminale e' anche coinvolta in meccanismi di traduzione del segnale, interagendo con proteine come la PLC- $\gamma$  e la famiglia di chinasi Src. La porzione C-terminale, denominata regione di legame ai microtubuli, regola la velocità di polimerizzazione dei microtubuli. Tale regione e' anche coinvolta nel legame di proteine funzionali, come la protein fosfatasi 2A (PP2A) e la presenilina 1 (PS1).

L'affinità di tau per i microtubuli dipende (i) dal numero di ripetizioni carbossi-terminali leganti i microtubuli citoscheletrici (R1-R4); (ii) dall'interazione con la membrana plasmatica; (iii) dalle sequenze basiche ricche in prolina fiancheggianti i domini ripetuti R1-R4; (iv) dallo stato di fosforilazione.

Le sei isoforme differiscono l'una dall'altra i) nel numero di ripetizioni leganti la tubulina di circa 31-32 aa , che possono essere tre (3R-tau) o quattro (4R-tau) (fig.7); ii)

dall' assenza (0N) o presenza di uno (1N) o due (2N) inserti di 29 aa nella porzione amino-terminale della proteina non direttamente coinvolti nel legame ai microtubuli (fig. 7) (Ballatore et al., 2007). Nel cervello umano adulto, il rapporto tra le isoforme 3R e 4R e' circa 1 e le isoforme 1N, 0N e 2N comprendono circa il 54%, 37% e 9%, rispettivamente della tau totale. Ciascuna di queste isoforme ha probabilmente un particolare ruolo fisiologico poiche' sono differenzialmente espresse durante lo sviluppo. Infatti nel cervello fetale e' espressa solo l'isoforma piu' corta (3R/0N), mentre nel cervello adulto sono rappresentate tutte le altre 6 isoforme. Inoltre, esiste un' isoforma della proteina tau con un alto peso molecolare (120kDa) che e' espressa esclusivamente nei neuroni del sistema nervoso periferico e che contiene un esone addizionale nella porzione amino-terminale (Shahani and Brandt, 2002).

## ***Le funzioni biologiche delle proteine Tau***

Come detto, le proteine tau sono proteine modulari, costituite cioe' da diversi motivi funzionali.

### ***Il dominio amino-terminale***

Per quanto riguarda il dominio amino-terminale o dominio di proiezione in membrana, l'esatta funzione non e' stata ancora ben compresa: e' stato proposto che esso serva per creare il giusto spazio tra i microtubuli negli assoni e nei dendriti neuronali (Chen et al., 1992). Tale dominio lega la membrana plasmatica ma interagisce anche con altre proteine del citoscheletro, come le proteine del neurofilamento (Hirokawa et al., 1988) che, come tau, giocano un ruolo importante nel mantenere la normale architettura e il calibro assonale dei neuroni. In questa regione sono stati identificati dei motivi che includono la sequenza KKXX (esoni 2 e 3) che promuovono un piu' efficiente *bundling* dei microtubuli ( Kanai et al., 1992). I motivi PPXXP o PXXP nella regione ricca in prolina possono giocare un ruolo nel legame di tau ad altre proteine associate alla membrana plasmatica, in particolar

modo quelle con i domini SH3 (Arrasate et al., 2000), come le tirosin chinasi non recettoriali appartenenti alla famiglia src e fyn.

In particolare, il legame di tau a fyn o alle famiglie src porterebbe alla fosforilazione in tirosina di tau (Lee et al., 2005). Al contrario della fosforilazione di tau che avviene prevalentemente su residui di serina e treonina mappanti nella regione C-terminale di interazione al citoscheletro, la fosforilazione della tirosina (Tyr 18) non influenza la capacità della proteina di legare i microtubuli.

La fosforilazione di tau in tiroxina ha infatti diversi ruoli:

- nelle cellule neuronali garantisce la corretta citoarchitettura, contribuendo alla crescita neuritica soprattutto a livello del cono di crescita (Ignelzi et al., 1994).
- supporta il ruolo di tau nei processi neuronali di transduzione del segnale.

Recentemente è stato inoltre dimostrato che tau fosforilata in tiroxina è significativamente aumentata nei cervelli AD, accumulandosi nelle *tangles* neurofibrillari (Lee et al., 2004; Vega et al., 2005).

### ***Il dominio carbossi-terminale***

L'estremità carbossi-terminale di tau include i domini di ripetizione e di ancoraggio ai microtubuli (fig.8), controllandone quindi la stabilità (Mandelkow et al., 1995; Goedert et al., 1991). Il dominio di legame ai microtubuli contiene 3 (3R-tau) o 4 (4R-tau) sequenze ripetitive simili ma non identiche di 31 o 32 residui amminoacidici. Ogni ripetizione è costituita da 18 aa altamente conservati, responsabili del legame con la tubulina (Goode et al., 1997). L'isoforma 4R lega i microtubuli con un'affinità più alta ed è più efficiente nel promuovere l'assemblaggio dei microtubuli rispetto all' isoforma 3R ( Buee et al., 2000). Il motivo di tale specificità sta nel fatto che la regione amminoacidica, che induce la polimerizzazione in modo prominente, è localizzata tra le ripetizioni 1 e 2; tale inter-regione è unica nell'isoforma 4R, e determina una differenza di circa 40 volte nell'affinità di legame tra le due differenti isoforme (Buee et al., 2000).

L'interazione tra tau e i microtubuli può avvenire in due diverse modalità:

- (i) tau si lega sulla superficie esterna dei microtubuli precedentemente già assemblati (Al- Bassam et al., 2002)

(ii) tau, coincubata con la tubulina, e' incorporata nei microtubuli in crescita come una struttura integrale (Kar et al., 2003).

Il ruolo di tau nello stabilizzare i microtubuli è stato inequivocabilmente dimostrato in quanto, eliminando la sua funzione in cellule neuronali mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisense, si interferiva significativamente con i processi di elongazione e crescita neuritica (Caceres and Kosik 1990). D'altro canto, nelle cellule non-neuronali l'espressione di tau induce la formazione di lunghe estensioni citoplasmatiche portando al "bundling" e alla stabilizzazione dei microtubuli (Knowles et al., 1994). Inoltre, poiché il sito di legame di tau sulla molecola della tubulina si sovrappone con quello di altre proteine come la chinesina, l'ATPasi che supporta il trasporto assonale anterogrado, l'overespressione di tau inibisce il traffico delle vescicole, dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico lungo i neuriti (Ebner et al., 1998). Infatti Stamer e colleghi (Stamer et al., 2002) e Tatebayashi e colleghi (Tatebayashi et al., 2004) dimostrarono che modificazioni sito-specifiche dello stato di fosforilazione di tau alterano sia la capacità della proteina di legare i microtubuli che interferiscono con il suo legame alla chinesina ed ad altri motori molecolari e quindi con il trasporto assonale.

Recenti studi hanno inoltre dimostrato che le proteine tau legano l'RNA attraverso il dominio di legame ai microtubuli (Kampers et al., 1996). Le isoforme nucleari di tau sono simili a quelle citoplasmatiche, sebbene abbiano una solubilità più bassa probabilmente in quanto esse subiscono specifiche modificazioni post-traduzionali o in quanto interagiscono con altre proteine, quali le proteine Eed (Buee et al., 2000).

Infine recenti esperimenti dimostrano un ruolo della regione C-terminale nel modulare lo stato di fosforilazione delle proteine tau stesse; infatti la sequenza di tau inclusa tra i residui 224 e 236 è sia sito di legame ai microtubuli che di interazione con la protein fosfatasi 2A (PP2A), cosicché il citoscheletro potrebbe indirettamente inibire l'attività della PP2A competendo per il legame di tau su tale dominio (Buee et al., 2000).

## La proteolisi di tau

La proteina tau in vivo è troncata nel dominio C-terminale, sia al sito Glu391 che al sito Asp421 (Garcia-Sierra et al., 2008). E' stato ipotizzato che tali forme tronche possano giocare un ruolo importante nella morte cellulare neuronale e nella formazione dei PHF. Infatti frammenti di tau caspasi-derivati e tagliati al sito Asp421, quando introdotti in colture cellulari, causano apoptosi e fibrillano più rapidamente che la controparte wild-type. Inoltre frammenti di tau tronchi al sito Glu391, presenti nel cervello di pazienti affetti AD ma non in quello di anziani di controllo non dementi, sono uno dei maggiori costituenti del *core* dei PHF (Chun and Johnson., 2007). La famiglia delle caspasi e delle calpaine sono principalmente coinvolte nella proteolisi di tau, sia *in vivo* che *in vitro*. Infatti e' stato dimostrato che tale proteasi apoptotiche sono entrambe attivate dal peptide A $\beta$  e sono presenti nei neuroni degeneranti dei cervelli di casi AD (Chun and Johnson., 2007), in stretta colocalizzazione con gli aggregati fibrillari di tau. Recentemente e' stato poi dimostrato che il peptide A $\beta$  pre-aggregato induce *in vitro* la formazione di un frammento di 17kDa di tau in colture di neuroni ippocampali, e che gli inibitori della calpaina-I ne prevengono completamente la formazione, riducendo contestualmente la morte neuronale A $\beta$ -mediata (Park and Ferreira., 2005).

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno poi dimostrato che anche l'estremità aminotermine di tau è processata da tali proteasi apoptotiche. Infatti la caspasi-6 taglia tau all' aminoacido D13 *in vitro* (Horowitz et al., 2004), mentre l'estremità amino-terminale della proteina viene perduta non appena le *tangles* diventano extracellulari (Binder et al., 2005).

Rohn e colleghi (Rohn et al., 2002), ipotizzando un probabile sito *consensus* per la caspasi -3 tra gli aminoacidici 25 e 35 dell'N-terminale di tau, hanno sintetizzato un anticorpo che non cross-reagisce con la tau intera *wild-type* diretto contro tale neo-epitopo. Mediante analisi di immunoistochimica su sezioni di cervelli AD, hanno mostrato una diffusa marcatura lungo i filamenti neuritici, i grovigli neurofibrillari e i neuriti distrofici. Al contrario nessuna immunoreattività e' visibile nelle sezioni di controllo.

Il processo di maturazione delle *tangles*, implica una serie ordinata di eventi di fosforilazione, di cambiamenti conformazionali e di tagli sia all'estremità amino- sia all'estremità carbossi-terminale di tau (Chun and Johnson., 2007) suggerendo così che la proteolisi della proteina influenza direttamente la formazione e l'aggregazione delle fibrille *in vivo* (Binder et al., 2005).

## **Il ruolo dei mitocondri nel morbo di Alzheimer**

Una delle alterazioni neuropatologiche più marcate riscontrate nel cervello dei pazienti affetti da AD è a carico dei mitocondri, gli organelli che presiedono ai processi di produzione di ATP cellulare. In particolare, negli ultimi venti anni, molte ricerche si sono focalizzate sul chiarire il coinvolgimento dei mitocondri e dei difetti della fosforilazione ossidativa nella patologia AD.

La riduzione del metabolismo energetico cerebrale sembra essere direttamente correlata al decorso clinico della malattia e può precedere anche di molti anni lo sviluppo delle evidenze anatomico-patologiche e/o la comparsa dei sintomi (Reddy and Beal, 2005; Petrozzi et al., 2007).

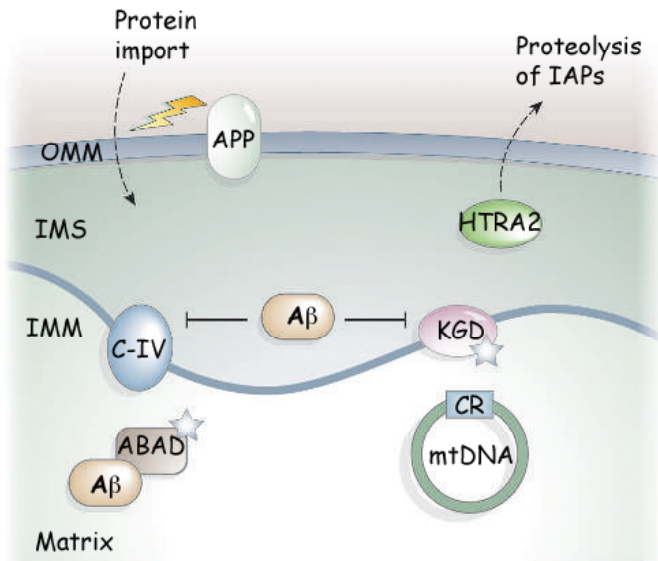
Difetti del metabolismo energetico, a seguito di anomalie della respirazione mitocondriale, sono inoltre anche una caratteristica delle cellule periferiche (piastrine e fibroblasti) dei pazienti AD. È stato dimostrato infatti che l'attività della citocromo c ossidasi diminuisce notevolmente nei mitocondri delle piastrine dei pazienti AD rispetto ai pazienti di controllo (Reddy and Beal, 2005).

È importante considerare però che sebbene numerose anomalie genetiche a carico degli enzimi mitocondriali siano state riscontrate nei casi sporadici di AD, suggerendo pertanto un probabile ruolo nell'eziopatogenesi della malattia, non è ancora chiaro se la disfunzione mitocondriale e quindi la diminuzione del metabolismo cerebrale siano di per sé causa o conseguenza della patologia. L' "ipotesi della cascata mitocondriale" (fig. 9), in analogia con quella del peptide A $\beta$ , infatti assume che mutazioni somatiche del DNA mitocondriale potrebbero causare un blocco energetico, un' aumentata produzione di ROS ed un accumulo del peptide A $\beta$ , che in una sorta di "circolo vizioso", rafforzerebbe ulteriormente il danno del DNA mitocondriale e lo stress ossidativo.

Tale ipotesi è corroborata dall'osservazione che difetti genetici primari della catena mitocondriale e il peptide A $\beta$  possono spesso agire in sinergia nella progressione della malattia di AD.



## Alzheimer's disease



**Fig. 9:** Ipotesi della “cascata dei mitocondri”. Nell’AD, la produzione di ROS e l’inibizione del metabolismo energetico, aumentano i livelli di A $\beta$ , che puo’ provocare disfunzioni mitocondriali. L’A $\beta$  inibisce il complesso IV e l’ $\alpha$ -chetoglutarate deidrogenasi (KGD) e lega la deidrogenasi alcolica (ABAD). Sia KGD che ABAD producono ROS (stelle bianche). La proteina APP localizzata nell’OMM (membrana mitocondriale esterna), puo’ interferire col sistema di importo delle proteine. Nei mitocondri e’ presente anche la presenilina l’attivita’ proteolitica di HTRA2 che inibisce l’inibitore citosolico delle proteine apoptotiche (IAPs). I pazienti AD hanno inoltre un maggior numero di mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) rispetto ai pazienti di controllo.

L’attivita’ degli enzimi COX e il complesso dell’  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi, che è significativamente ridotta nei cervelli dei pazienti AD, è fortemente inibita dal peptide A $\beta$ . Inoltre l’alterazione della catena di trasporto degli elettroni, indotta da forme solubili o insolubili del peptide A $\beta$ , limita drasticamente non solo la produzione di ATP ma determina anche l’aumento della produzione dei dannosi ROS (fig. 9) (specie reattive dell’ossigeno) con conseguente danno ossidativo delle proteine cellulari (Reddy and Beal, 2005). L’aumento dei livelli intracellulari di A $\beta$  può non solo contribuire al danno causato da difetti genetici della COX associati a casi sporadici di AD, ma anche facilitare l’apertura degli MPTP o pori di transizione della permeabilita’ mitocondriale causando così la morte cellulare (Petrozzi et al., 2007). A tal proposito Yan e colleghi (Du et al., 2008) hanno recentemente dimostrato che i peptidi A $\beta$  interagiscono direttamente con la

ciclofilina D (che è parte integrante del poro) sia nei reperti autoptici di cervello di pazienti AD che nei mitocondri corticali di topi transgenici overesprimenti una forma mutata dell'APP umana. Gli autori hanno poi dimostrato che l'interazione A $\beta$ -ciclofilina D mitocondriale è responsabile dell'aumentata produzione di ROS e della riduzione del potenziale di membrana mitocondriale, con conseguente rilascio del citocromo c ed apoptosi. Inoltre la perdita di ciclofilina D in tale modello animale di AD, alleviava significativamente sia la riduzione delle sinapsi che la diminuzione del potenziamento a lungo termine (LTP) indici di uno stadio di neurodegenerazione avanzato. Da un'altra parte, il malfunzionamento mitocondriale e lo stress ossidativo possono alterare il processamento dell'APP, aumentando l'attività della  $\beta$ -secretasi e portando ad un accumulo intracellulare del peptide A $\beta$  (Petrozzi et al., 2007).

Diversamente dal peptide A $\beta$ , ancora poco è noto rispetto al ruolo della proteina tau nel malfunzionamento mitocondriale associato all'AD.

Takeda e colleghi (Takeda et al., 2000) hanno evidenziato una stretta correlazione tra la iperfosforilazione patologica di tau riscontrata nei grovigli neurofibrillari e i difetti del metabolismo energetico mitocondriale. Gli autori infatti dimostrano che nell'AD l'induzione compensativa dell'emeossigenasi coincide con un'aumentata immunoreattività di tau per l'anticorpo Alz50, che riconosce sia cambi conformazionali che dello stato di fosforilazione della proteina nei primi stadi di maturazione delle *tangles*. Essi inoltre dimostrano che la 4-idrossinonenale (HNE), un'aldeide reattiva prodotta durante la perossidazione lipidica che aumenta la abilità di tau a formare filamenti *in vitro* (Pérez et al., 2000), reagisce con la proteina tau normale e ne induce la comparsa dell'epitopo Alz 50. Mandelkow e Stamer (Mandelkow et al., 2003; Stamer et al., 2002) hanno dimostrato, sia in cellule neuronali che non quali i neuroni corticali, le cellule della retina e una linea umana di neuroblastoma, che tau è capace di ridurre il trasporto assonale netto anterogrado delle vescicole secretorie, dei mitocondri e degli organelli cellulari causando in ultimo stress ossidativo, ridotta biodisponibilità dell'ATP alle sinapsi e morte neuronale. Alti livelli intracellulari della tau *wild type* inibiscono infatti il trasporto assonale chinesina-mediato dei perossisomi, dei neurofilamenti e delle vescicole derivate dal corpo del Golgi lungo i processi neuritici fino alle sinapsi. Infine tau inibisce il trasporto dell'APP negli assoni e nei dendriti, causandone il suo accumulo nel corpo cellulare. (Stamer et al., 2002).

## **Modelli utili allo studio del morbo di Alzheimer**

I modelli cellulari ed animali sono uno strumento di estrema importanza per lo studio delle malattie neurodegenerative. Infatti numerosi paradigmi sperimentali *in vitro* e *in vivo* sono utilizzati non solo per comprendere il meccanismo molecolare delle malattie, ma anche per testare la sicurezza e l'efficacia di potenziali nuovi farmaci applicabili in terapie. La creazione di modelli transgenici e knockout ha permesso di fare passi in avanti nello studio di tali patologie; “knocking in” di specifiche mutazioni e “knocking out” condizionato di alcuni geni in tessuti specifici ed/o in modo tempo-dipendente sono stati estremamente utili alla comprensione e allo studio delle basi molecolari dei disordini neurodegenerativi. Tuttavia i disordini più complessi sono tuttora una “sfida” in quanto è difficile riprodurre un modello che completamente rifletta il fenotipo neurodegenerativo.

### **Modelli cellulari**

I modelli *in vitro* utilizzati in questo lavoro sperimentale sono:

- (i) le cellule di neuroblastoma umano SY5Y differenziate con NGF-dbAMPc ed indotte in apoptosi mediante trattamento con staurosporina (STS).
- (ii) le cellule di neuroblastoma umano SY5Y differenziate con acido retinoico/BDNF ed indotte in apoptosi mediante deprivazione di BDNF
- (iii) le colture ippocampali di ratto indotte in apoptosi mediante trattamento con il peptide A $\beta$ .
- (iv) le cellule di ratto PC12 differenziate con NGF ed indotte in apoptosi mediante deprivazione di NGF

Come ho detto in precedenza, diversi studi hanno dimostrato la presenza di caspasi e calpaina attive nei neuroni apoptotici AD e che la proteina tau stessa è substrato di entrambe tali proteasi (Canu et al.,1998; Park and Ferreira, 2005; Gamblin et al.,2003). Pertanto al fine di identificare se il frammento N-terminale di tau, che precedenti studi avevano dimostrato essere neurotossico quando overespresso in colture ippocampali e

corticali (Amadoro et al., 2004; Amadoro et al.,2006), fosse effettivamente prodotto *in vitro* in corso di apoptosi neuronale, abbiamo utilizzato la linea cellulare di neuroblastoma umano SY5Y differenziata con NGF-dbcAMP o con acid retinoico /BDNF così da ottenere una popolazione omogenea caratterizzata da un fenotipo neuronale maturo. Tali protocolli di differenziamento non solo aumentano il contenuto proteico totale di tau, ma anche il suo stato di fosforilazione promuovendo una evidente crescita neuritica. Inoltre contestualmente all'acquisizione del fenotipo neuronale, tale linea non solo esibisce una più alta espressione di alcuni specifici marcatori neuronali-come l'enolasi neurone-specifica e la Proteina 43 associata alla crescita (GAP-43)- ma diventa anche dipendente dal supporto neurotrofico per la sua sopravvivenza. Infine la rimozione della specifica neurotrofina o l'esposizione alla staurosporina, un generale inibitore delle protein-chinasi, causano una morte per attivazione delle caspasi e calpaina-I (Neumar et al., 2003) accompagnata da frammentazione oligonucleosomale del DNA e condensazione della cromatina (Encinas et al., 1999; 2000).

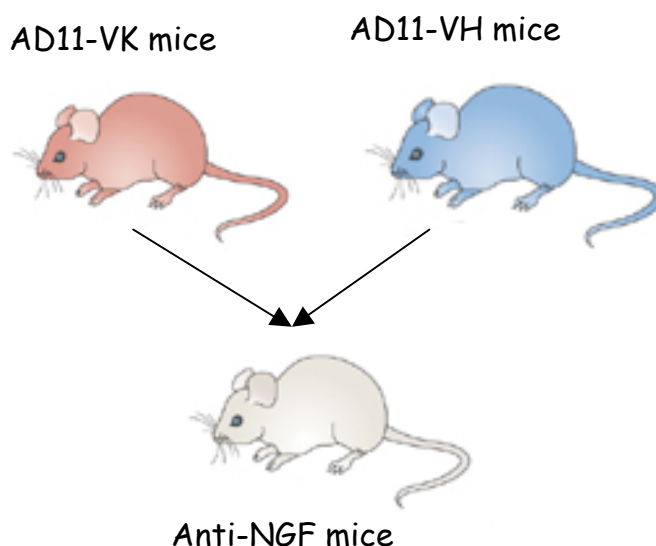
Come per il neuroblastoma umano, anche la linea cellulare PC12 derivante dal feocromocitoma di ratto viene differenziata in presenza di NGF ed in assenza di siero, acquisendo un fenotipo neuronale caratterizzato da prolungamento dei neuriti, con formazione delle vescicole sinaptiche ed eccitabilità elettrica (Greene 1978). La rimozione dell' NGF, indispensabile per la loro sopravvivenza, provoca iperfosforilazione di tau ed una morte di tipo apoptotico con attivazione delle proteasi caspasi e calpaina-I (Zhang and Johnson., 2000).

Abbiamo infine utilizzato anche i neuroni ippocampali esposti al peptide A $\beta$ , in quanto tale popolazione neuronale è selettivamente perduta nell'AD. Le colture primarie neuronali sono mantenute per almeno 3 settimane *in vitro*, in modo tale che siano in grado di riprodurre tutte le caratteristiche funzionali e biochimiche (inclusa l'espressione delle isoforme adulte di tau) dei neuroni ippocampali maturi. A seguito del trattamento con il peptide A $\beta$  in tale modello la tau è iperfosforilata in specifici siti patologici riscontrati nei grovigli neurofibrillari dell'AD ed è tagliata dalla calpaina-I e della caspasi-3 (Park and Ferreira, 2005; Gamblin et al.,2003; Kelly et al.,2005; Park and Ferreira, 2007). Infine tale paradigma fornisce un utile riscontro sperimentale dell'ipotesi della cascata dell'amiloide, suggerendo un potenziale meccanismo attraverso cui la proteina tau potrebbe mediare, almeno in parte, la neurotossicità indotta da A $\beta$  nei neuroni ippocampali.

## Il modello animale AD11

Il modello murino e' stato ottenuto creando un topo transgenico che esprimesse *in vivo* un anticorpo monoclonale diretto contro l'NGF (Cattaneo et al., 1998).

Mediante tecniche di ingegneria genetica, le catene pesanti e leggere dell'anticorpo mAb  $\alpha$ D11 anti-NGF sono state unite alle regioni invariabili umane  $\kappa$  e  $\gamma$ 1, producendo un anticorpo  $\alpha$ D11 anti-NGF chimerico umano/ratto (fig.10) (Ruberti et al., 1997). L'incrocio tra topi esprimenti la catena leggera e topi esprimenti la catena pesante genera una prole doppio-transgenica esprime un anticorpo  $\alpha$ D11 anti-NGF funzionale (Capsoni et al., 2000).



**Fig.10:** Rappresentazione dell'incrocio dei topi transgenici AD11-VK e AD11-VH per ottenere il topo doppio-transgenico esprime un anticorpo  $\alpha$ D11 anti-NGF funzionale (*AD11 mice*).

Il livello di NGF nel cervello dei topi transgenici di due mesi e' circa il 53% in meno rispetto a quello dei topi di controllo (Ruberti et al., 2000). In tali topi tau viene iperfosforilata precocemente (gia' a due mesi) a livello della corteccia entorinale e dell'ippocampo. A due mesi e' stata poi dimostrata la progressiva riduzione della ChAT nei neuroni colinergici del proencefalo basale. A partire dai sei mesi di eta' invece sono evidenti depositi extracellulari, mentre le placche di  $A\beta$  sono state osservate solo nel cervello di topi di 15 mesi, stadio in cui sono evidenti anche i grovigli neurofibrillari

(Capsoni et al., 2002). Nei topi adulti e' evidente una dilatazione dei ventricoli ed una marcata atrofia della corteccia cerebrale e dell'ippocampo (Capsoni et al., 2000b). Nei topi adulti inoltre, quasi il 90% dei neuroni corticali mostra una notevole marcatura per anticorpi anti-tau diretti contro epitopi fosforilati della proteina mentre sono evidenti depositi neurofibrillari e neuriti distrofici a livello della corteccia.

La progressione della neurodegenerazione e' in correlazione con le alterazioni funzionali, quali la diminuzione della plasticita' sinaptica corticale ed ippocampale ( Sola et al., 2006) ed inoltre sono evidenti deficit cognitivi della memoria ( De Rosa et al., 2005).

Il modello animale AD11 quindi ricapitola le lesioni istologiche e le caratteristiche comportamentali tipiche dei pazienti affetti dal morbo di Alzheimer.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Materiali***

Anticorpi utilizzati in tale lavoro: L'anticorpo policlonale CCP-NH<sub>2</sub>-tau e' gentilmente fornito dal Dott. T.T. Rohn (Boise State University U.S.A); C17, un anticorpo policlonale (capra) fosforilazione-indipendente che riconosce l'estremità COOH-terminale della proteina tau; l'anticorpo monoclonale defosforilazione-dipendente mAb TAU-1 è fornito da Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany); gli anticorpi monoclonali fosforilazione-dipendenti mAb PHF-1(Greenberg and Davies, 1990), PHF-6 (Hoffman et al., 1997) e mAb sono stati gentilmente forniti da Dr. V. Lee (Dipartimento di Patologia e Laboratorio di Medicina, Università di Pennsylvania Scuola di Medicina, Philadelphia, PA U.S.A.); l'anticorpo policlonale diretto contro il frammento attivo della calpaina-1 (cleaved-calpain-I) sono forniti da Sigma; gli anticorpi policlonali diretti contro il frammento attivo della caspasi-3 (Asp 175) (cleaved-Caspase-3) sono forniti da Cell Signaling (New England, Biolabs Ltd.). L'anticorpo monoclonale tau13 (epitopo NH<sub>2</sub>.13, fosforilazione indipendente e' fornito da Santa Cruz Biotechnology.; L'anticorpo monoclonale AT8 (epitopi Ser-202, Thr-205 fosforilazione-dipendente) e' fornito da Biosource International; L'anticorpo monoclonale Tau-5 e l'anticorpo monoclonale ChAT (colina acetil transferase) sono forniti da Chemicon; L'anticorpo monoclonale HT7 (epitopi aa159-163 fosforilazione indipendente) e' fornito da Immunogenetics.; L'anticorpo policlonale C31 anti capsase(s)- cleaved APP (Asp 664) e' fornito da Chemicon.; L'anticorpo monoclonale Anti-truncated tau Asp 421 e' fornito da Upstate Biotechnology; L'anticorpo monoclonale T-46 (aa 428-441) e' fornito da Cell Signaling Technology; L'anticorpo monoclonale  $\beta$ -actin e' fornito da Sigma –Aldrich; L'anticorpo policlonale  $\beta$  III tubulin e' fornito da Abcam; L'anticorpo monoclonale  $\alpha$ -tubulina e l'anticorpo monoclonale per il NF200 sono forniti da Sigma–Aldrich; L'anticorpo monoclonale NSE Enolasi neurone specifica e' fornito da Novus Biologicals; L'anticorpo policlonale TH (anti- tirosina idrossilasi) e' fornito da Santa Cruz Biotechnology, INC; L'anticorpo policlonare anti-recettore muscarinico M1, e' fornito da Sigma –Aldrich.

L'inibitore generale delle caspasi Z-VAD-fmk è fornito da Biomol International, mentre gli inibitori selettivi per la caspasi-3 -Ac-DEVD-CHO- e per la calpaina-I -MDL-28170 sono forniti da Calbiochem (San Diego, CA). La staurosporina e il veicolo DMSO(dimethylsulfoxide) sono provvisti da Sigma –Aldrich (Oakville, Ontario, Canada)

### ***Colture cellulari e trattamenti***

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.), vengono mantenute in coltura nel terreno di crescita DMEM/F12 (Invitrogen) arricchito con 10% FBS (Siero fetale bovino) supplementato con 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomina (Invitrogen) alla temperatura di 37° C in un'atmosfera satura di umidità contenente 95% aria/ 5% CO<sub>2</sub>. Il terreno di crescita viene cambiato ogni due giorni. Le cellule *naive*, quando raggiungono il 20% circa della confluenza, vengono differenziate mediante incubazione con il terreno DMEM/F12 (Invitrogen) arricchito di N2 (Invitrogen) dbcAMP 1mM (Sigma) e NGF 100ng/ml per 5-6 giorni. (Per tutti i trattamenti il terreno con gli additivi sopra indicati, viene cambiato dopo 1 giorno e dopo 3 giorni). Per indurre il differenziamento con acido retinico e BDNF le cellule vengono piastrate ad una densità iniziale di 10<sup>4</sup> cellule/cm<sup>2</sup> su piastre di coltura collagenate. Il giorno dopo la semina viene aggiunto acido retinico ad una concentrazione finale di 10µM nel terreno DMEM/F12 arricchito con 15% FBS. Dopo cinque giorni di trattamento con acido retinico, le colture passano in un terreno costituito da DMEM/F12 contenente BDNF 50 ng/ml, senza siero.

### ***Allestimento di colture primarie di neuronali***

Colture arricchite in granuli sono state ottenute da cervelletti di ratti Wistar (Charles River, Calco Italia) di 8 giorni, come descritto da Levi et al., (1984). Brevemente, i cervelletti vengono triturati meccanicamente in frammenti di 0.4mm e sospesi nella soluzione di Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), addizionata con Albumina Bovina (BSA, Sigma) 3mg/ml e MgSO<sub>4</sub> 1.2mM; dopo una rapida centrifugazione a 1500xg, il tessuto è risospeso nella stessa soluzione, contenente ora tripsina 0,25mg/ml, e successivamente incubato a 37°C per 15 min. Infine, la sospensione cellulare è addizionata con la soluzione



KRB contenente DNAasi (Sigma) 80µg/ml, l'inibitore della tripsina (Sigma) 0.5mg/ml e MgSO<sub>4</sub> 2.7mM ed è dissociata meccanicamente con pipetta pasteur. Dopo 10 min di sedimentazione, si raccoglie il supernatante e si procede ad una seconda dissociazione meccanica del sedimento. I due supernatanti così ottenuti sono aggiunti alla soluzione KRB, addizionata con BSA 3mg/ml, MgSO<sub>4</sub> 2.4mM e CaCl<sub>2</sub> 0.1mM, e si lasciano sedimentare per altri 10 min. Dopo una centrifugazione di 10 min a 1500xg, le cellule sono risospese nel terreno di coltura.

Le cellule sono state piastrate in BME (Basal Medium Eagle, Life Technologies) aggiunto di 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*), Life Technologies, inattivato per 30 min a 56°C), 25mM KCl, gentamicina (Life Technologies) 100µg/ml e glutammina (Sigma) 2mM, su piastre da 24 pozzetti (Costar) pretrattate per 20 min con una soluzione poli-L-lisina (Sigma) 5-10µg/ml, ad una densità di 0.5x10<sup>6</sup> cellule per pozzetto. Per prevenire la proliferazione di cellule gliali non-neuronali, 18-22 ore dopo il piastramento è stato aggiunto al mezzo di coltura 1β-Arabinofuranosilcitosina 10µM. Le piastre di coltura sono state incubate a 37°C in un'atmosfera 95% aria/ 5% CO<sub>2</sub>.

Culture primarie arricchite al 95% di neuroni cerebrali ippocampali sono preparate da embrioni di 17 giorni da ratte Wistar gravide (Charles Wistar, Calco Italia) come precedentemente riportato (Pillot et al., 1999). Brevemente, le cellule dissociate sono piastrate a densità di 10<sup>5</sup> cellule/cm<sup>2</sup> su piastre di plastica o vetrini portaoggetti di vetro precedentemente trattati con poli-DL-ornitina (1.5 o 15 µg/ml, rispettivamente). I neuroni ippocampali sono coltivati in mezzo di coltura Eagle modificato da Dulbecco, addizionato di mezzo privo di siero/F12 nutriente-mix in rapporto 1:1 supplementato con 500nM insulina, 60µM putrescina, 100µM transferrina, 100nM progesterone e 0,1%(w/v) ovoalbumina. Le colture sono mantenute a 37°C in un'atmosfera 95%aria / 5%CO<sub>2</sub>.

### ***Preparazione di omogenati cellulari e mitocondri***

Il mezzo di coltura viene rimosso e le colture arricchite in granuli vengono lavate con PBS (soluzione salina), contenente 138mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4. L'integrità cellulare è saggiata quantitativamente sulla base di due parametri respiratori: l' inabilità delle cellule di ossidare il succinato aggiunto dall'esterno e la capacità della ouabaina di bloccare il trasporto del glucosio. Gli omogenati vengono

preparati da una sospensione cellulare utilizzando un omogenizzatore di vetro a temperatura ambiente. L'enzima lattato- deidrogenasi citosolica viene rilasciata e ulteriori trattamenti con Triton X-100 non ne provoca ulteriori rilasci. I mitocondri vengono poi isolati dagli omogenati cellulari. L'omogenato cellulare viene centrifugato a 1500xg per 10 minuti. Il pellet viene risospeso e ricentrifugato nuovamente a 1500xg per 10 minuti. I due supernatanti vengono uniti e centrifugati di nuovo a 1500xg per 10 minuti. Il supernatante ottenuto viene centrifugato a 17000xg per 11 minuti. Il pellet rappresenta la frazione mitocondriale. I mitocondri purificati vengono incubati in PBS e vengono testati sia per la loro capacità di accoppiamento misurando gli indici di controllo respiratori (l' *uptake* dell'ossigeno prima e dopo aggiunta di ADP) come indice della capacità di produrre ATP, sia per la loro integrità misurando nei supernatanti post-mitocondriali le attività dell'adenilato chinasi e glutammato deidrogenasi. Il contenuto proteico è determinato secondo Waddel e Hill (Waddel and Hill., 1956).

### ***Misure Polarografiche***

L'attività respiratoria nei mitocondri isolati è stata misurata con un metodo polarografico, realizzato attraverso l'uso dell'elettrodo ad ossigeno di Clark. Gli omogenati cellulari (circa 0.2 mg) sono incubati in camere termostate alla temperatura di 25°C. Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti ad esaurire i substrati endogeni, mediante una pre-incubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori. Le misure polarografiche vengono effettuate come analisi substrato-inibitore in presenza di 1mM ADP o 0.12µM FCCP. Gli inibitori ed i substrati usati sono i seguenti: 5mM β-idrossibutirrato, 3µM rotenone, 5mM succinato, 0,8µM antimicina A. Il consumo di ossigeno è espresso in ngatomi al minuto per mg di proteine mitocondriali.

### ***Misure del carrier ADP/ATP***

Gli omogenati cellulari (circa 0.1 mg ), contenente i mitocondri, sono incubati a 25 °C in 2 ml di terreno contenente 200mM saccarosio, 10mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub> e 20mM HEPES-Tris pH 7.2. La comparsa dell'ATP nella fase extramitocondriale, dovuta all'aggiunta esterna di ADP, viene saggiata usando un sistema di rivelazione dell'ATP (Atlante et al., 2006) consistente di glucosio (2.5mM), esochinasi (HK 0.5 e.u.), glucosio-6fosfato-deidrogenasi

(0.5 e.u.), e NADP<sup>+</sup> (0.2mM) in presenza di P<sub>1</sub>,P<sub>5</sub>-Di (adenosina -5') penta fosfato (Ap5A), un inibitore specifico dell'adenilato chinasi. La percentuale di riduzione del NADP<sup>+</sup> nella fase extramitocondriale viene determinato in seguito all'aumento di assorbanza a 334nm misurata come la retta tangente alla parte iniziale della curva in progresso ed espressa come nmol NADP<sup>+</sup> H<sup>+</sup>/ min/mg proteine cellulari. Gli esperimenti di controllo sono condotti in presenza di atractiloside (ATR) in modo da assicurare che lo scambio ADP/ATP venga mediato esclusivamente dal traslocatore ANT (Atlante et al., 2006).

### ***Misura dell'attivita' dell'ATPasi***

L'attivita' dell'ATPasi viene saggiata misurando il rigonfiamento mitocondriale (Atlante et al., 1989), che avviene quando l'idrolisi dell'ATP viene indotta nei mitocondri isolata trattati con mersalyl ed incubati con ATP. Un minuto dopo l'aggiunta di mersalyl (20nmol mg<sup>-1</sup> proteine) alla sospensione mitocondriale, 2mM di ATP sono aggiunti e, dopo 1 minuto, l'idrolisi dell'ATP viene indotta aggiungendo 0,12 µM FCCP.

### ***Induzione di apoptosi***

L'apoptosi viene indotta mediante l'addizione di staurosporina (Sigma) ad una concentrazione finale di 0.5 µM, a diversi tempi di incubazione precisamente 1, 3, 6, 12 e 24h. Per quanto riguarda le cellule differenziate con BDNF, l'apoptosi e' indotta mediante rimozione di BDNF dal mezzo di coltura, cosi' come per le PC12 differenziate con NGF la cui apoptosi e' indotta mediante rimozione di NGF dal mezzo di coltura. Gli inibitori delle caspasi e della calpaina sono stati aggiunti un'ora prima del trattamento con staurosporina; in particolare gli inibitori utilizzati sono: Z-VAD-fmk (Biomol) che e' un inibitore delle caspasi ad ampio spettro, Ac-DEVD-CHO (Calbiochem) che e' l'inibitore selettivo della caspasi 3, MDL-28170 (Calbiochem) che e' l'inibitore della calpaina di tipo 1.

### ***Analisi di estratti proteici per Western Blotting***

Gli estratti proteici totali sono ottenuti lavando il monostrato cellulare con PBS , raccogliendo in un tampone (*RIPA-buffer*) di lisi (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl,

0.5% NP-40, 0.5% triton, 5mM EDTA piu' inibitori delle proteasi (Sigma) ed inibitori delle fosfatasi (Sigma) e centrifugati a 4°C a 16000Xg per 15 minuti. Il supernatante viene recuperato e successivamente denaturato mediante bollitura per 5 min. La concentrazione delle proteine è determinata spettrofotometricamente mediante saggio colorimetrico, utilizzando il sistema DC Protein Assay (BioRad). Pari ammontari di proteina sono caricati su gel a gradienti lineari 7.5%-15% (Invitrogen) e risolti elettroforeticamente sulla base del peso molecolare (Laemmli et al.,1970). Dopo elettro-trasferimento su membrana di nitrocellulosa (Hybond-C Amersham, Pharmacia), le proteine sono visualizzate utilizzando l'anticorpo primario appropriato. Tutti gli anticorpi primari sono diluiti in 0,5% (w/v) polvere di latte privo di grassi ed incubati con la nitrocellulosa per l'intera notte a 4 °C. Dopo incubazione con l'anticorpo secondario, diretto contro l'isotipo specifico e coniugato all'enzima perossidasi (diluizione a concentrazione opportuna in PBS), le bande sono visualizzate mediante reazione di chemiluminescenza utilizzando il sistema ECL (Amersham, Alington, Heights, IL U.S.A.). Quando necessario i filtri vengono disibridati con uno specifico buffer (100mM 2-Mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6.7) a 50°C per 30 minuti in agitazione.

### ***Misura della sopravvivenza neuronale***

La percentuale di neuroni vitali è stata valutata contando il numero dei nuclei intatti dopo lisi cellulare in una soluzione contenente detergente (Bromuro di etylexadecildimethylammonio 0.5%, Acido Acetico 0.28%, Triton X-100 0.5%, NaCl 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, in PBS pH 7.4) in base al metodo di Soto e Sonnenschein (1985) modificato da Volontè et al. (1994), o per saggio colorimetrico che si basa sulla capacità delle cellule vitali, sostenuta dall'attività enzimatica delle ossido-reduttasi mitocondriali, di ridurre il sale di tetrazolio MTT in un precipitato insolubile, come descritto da Manthorpe et al. (1986). In breve, il sale di tetrazolio (0.25 mg/ml) è stato aggiunto alla coltura neuronale ed incubato per 60-90 min a 37°C. Il mezzo di reazione è stato poi delicatamente aspirato ed i cristalli del precipitato di formazano prodotti sono stati solubilizzati in Isopropanolo/HCl 0.08M. La soluzione colorata così ottenuta è stata trasferita in piastre da 96 pozzetti e l'assorbanza viene stimata usando un Multiscan Plate

Reader a 570nm (LabSystem Multiskan MCC/340). L'intensità colorimetrica è direttamente proporzionale all'attività deidrogenasica mitocondriale delle cellule vitali.

### ***Analisi Citofluorimetrica a flusso.***

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y vengono raccolte e lavate due volte con PBS. Le cellule vengono incubate al buio per 10 minuti in ghiaccio con 12 ug/ml 7-amminoactinomicina D (7-AAD, Sigma), in 400µl di *buffer* di legame, e immediatamente dopo analizzate mediante citofluorimetria a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Sono stati acquisiti 50,000 eventi per ogni campione. Le acquisizioni sono state analizzate con Flowjo software (TriStar CA, USA). Abbiamo analizzato mediante citofluorimetria le cellule differenziate. L'intersezione delle cellule con il laser risulta in una diffusione della luce e l'analisi della luce diffusa in differenti direzioni fornisce specifiche informazioni riguardo la grandezza e la struttura cellulare. In dettaglio, l'intensità del segnale Forward-light-scatter (FSC) correla con la grandezza delle cellule mentre la funzione side-scatter associata a proprietà cellulari di luce riflessa e rifratta fornisce informazioni sulla disomogeneità ottica che deriva da modificazioni strutturali (condensazione nucleare e citoplasmatica, granulosità).

### ***Saggio ELISA per valutare la morte cellulare***

Per quantificare le cellule apoptotiche viene utilizzato un saggio ELISA (Roche) che si basa sulla "cattura" per affinità di nucleosomi liberi, seguita da rivelazione con anticorpi anti-istone. In questo saggio i mono e oligonucleosomi sono catturati da proteine leganti il DNA che rivestono i pozzetti di una piastra ELISA. Anticorpi anti-istone, coniugati con la biotina, si legano poi alla componente proteica istonica dei nucleosomi e sono poi rilevati dopo incubazione con streptavidina-HRP. Dopo l'induzione dell'apoptosi e trattamento con Z-VAd-fmk e DEVD, il terreno viene rimosso e vengono aggiunti 100µl di *buffer* di lisi ad ogni pozzetto ed incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. Il lisato viene centrifugato a 200xg per 10 minuti e 20µl di supernatante sono trasferiti su una piastra precedentemente ricoperta di streptavidina, a cui successivamente sono aggiunti 80µl di *mix* immunoreagente, composto da perossidasi anti-DNA e biotina anti-istone. La piastra

viene incubata per 2 ore a temperatura ambiente, dopo le quali la soluzione viene rimossa e ciascuno pozzetto viene lavato con 250 $\mu$ l di *buffer* di incubazione. Successivamente 100 $\mu$ l di una soluzione con il substrato vengono aggiunti ad ogni pozzetto ed incubati per 10 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza viene misurata a 450nm in un Victor 3V 1420 (Perkin Elmer).

### ***Immunofluorescenza***

In seguito ai trattamenti le cellule SH-SY5Y differenziate e di controllo sono lavate in PBS 1X pH 7.5 e sono fissate con 4% (w/v in PBS 1X) paraformaldeide per 15 min a temperatura ambiente (Corsetti et al., 2008). Le cellule sono lavate in PBS 1X pH 7.5, e successivamente permeabilizzate con 0,2% TritonX-100 - 0.1M Tris-HCl pH 7,4 per 5 min. I vetrini portaoggetto su cui giace il monostrato cellulare, sono saturati con 3% siero di capra in PBS 1X per 3h e successivamente sono incubati per l'intera notte con gli anticorpi indicati. L'anticorpo non legato viene rimosso mediante 3 lavaggi con PBS 1X. Infine i vetrini sono esposti ai corrispettivi anticorpi secondari ( Invitrogen) per ulteriori 30 min, mentre i nuclei sono colorati con Hoechst 33258 (Sigma, St.Louis, MO USA) 0,5mg/ml in PBS per 5 min. Gli anticorpi utilizzati per l'immunofluorescenza sono: NF-200 (Sigma 1:200), NH2-CCP tau (1:50), C31 ( Chemicon 1:200).

### ***Colorazione dei nuclei cellulari per HOECHST 33258***

Le colture sono state fissate con paraformaldeide 4% (w/v in PBS 1X) per 15 min a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono state poi lavate per 2 volte in PBS 1X pH 7.5, e permeabilizzate con Triton X-100 0.2%/ Tris HCl 0.1M pH 7.5 per 5 min. I nuclei sono stati infine marcati con l'agente intercalante HOECHST 33258 (Sigma), 1mg/ml in PBS 1X per 5min.

### ***Preparazione di estratti proteici da topi di controllo e topi AD11 transgenici***

Ippocampo e corteccia di topi di controllo e topi AD11 transgenici di 15 mesi vengono rimossi rapidamente dagli animali anestetizzati e rapidamente congelati in ghiaccio secco. Per l'analisi degli estratti proteici totali (Kim et al. 2001), pezzi (circa 0,1g) di tessuti congelati vengono scongelati in 5 volumi di *buffer* di lisi ( 20mM tris-HCl pH 7.4, addizionato di inibitori di proteasi), omogenizzati in ghiaccio e centrifugati a 13000xg per 15 minuti. Il supernatante viene quantificato e analizzato mediante Western blotting su gel continui SDS-PAGE alla concentrazione di acrilamide opportuna, o su gradienti lineari 7.5%-/15%, e risolti elettroforeticamente sulla base del peso molecolare (Laemmli et al.,1970).

### ***Immunoistochimica***

Topi transgenici di controllo e AD11, entrambi di 15 mesi, vengono anestetizzati con una soluzione al 2% di 2,2,2-tribrometano (2 $\mu$ l/g peso) e successivamente perfusi con paraformaldeide al 4% in PBS. I cervelli vengono rimossi, dopo la fissazione per 4 ore a 4°C e crioprotetti in una soluzione al 30% di saccarosio tutta la notte. Sezioni coronali (40 $\mu$ m di spessore) vengono raccolte in provette da 1,5 ml contenente 0,05% di Sodio azide in PBS. Per la rilevazione della caspasi-3, le sezioni vengono incubate in una soluzione 10mM di acido citrico (pH 4.5) in un forno a microonde, lavate con acqua bidistillata e TBST ( Tris buffer, 0.1M pH 7.4 addizionato di Triton X-100 allo 0,3%) e pre-incubate in una soluzione allo 0,3% di perossido di idrogeno per 30 minuti. Successivamente le sezioni vengono lavate in TBST e i siti aspecifici vengono saturati mediante incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di FBS al 10%. Per la rivelazione del frammento di tau, il trattamento con forno a microonde viene omesso.

Le sezioni vengono incubate per l'intera notte a 4°C con gli anticorpi primari diluiti in una soluzione di FBS al 10% in TBST. Per rivelare il frammento di tau, le sezioni sono incubate in una soluzione contenente l'anticorpo policlonale NH<sub>2</sub>-CCP-NH<sub>2</sub> tau ad una concentrazione di 0.12  $\mu$ g/ml; per rivelare la caspasi-3 attiva viene utilizzato un anticorpo

policlonale anti- caspasi-3 attiva ( Cell Signaling, 1:100) che riconosce il frammento di 17/19 KDa risultante dal taglio in corrispondenza dell'Asp175. Gli anticorpi primari vengono rivelati usando anticorpi secondari biotinilati e con il metodo ABC sviluppato con il 3,3- diaminobenzidina (DAB; per rivelare il frammento di tau) o il nitro blu tetrazolio (NBT) e bromocloroindolifosfato (BCIP) per la caspasi-3 attiva.

### ***Analisi statistica dei dati***

I dati relativi a tre esperimenti indipendenti, con quattro determinazioni per condizione, sono normalizzati rispetto ai valori del solo veicolo (posto pari a 100%).

I valori sono espressi come la media +/-S.E., mentre le differenze tra il controllo e i gruppi trattati, sono analizzate utilizzando Graph Pad Prism software mediante analisi della varianza one-way (ANOVA) seguito dal test di Dunnet per comparazione multiple. In alcuni esperimenti la significatività statistica viene analizzata mediante il test t-Student. La significatività statistica è indicata dal valore di p: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Le analisi fatte per gli studi di Western blotting e di immunofluorescenza sono rappresentativi di almeno tre differenti esperimenti.

Per quanto riguarda le analisi sui mitocondri, gli esperimenti sono condotti in triplicato e ripetuti almeno tre volte. I dati sono espressi come media +/- Deviazione Standard (D.S.) (n=3). La significatività statistica viene valutata mediante analisi della varianza one-way (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni per comparazioni multiple. Il valore p<0.05 è considerato significativo per tutte le analisi effettuate.



## ***Risultati***

### ***Sviluppo di una popolazione neuronale derivante da cellule umane SH-SY5Y mature***

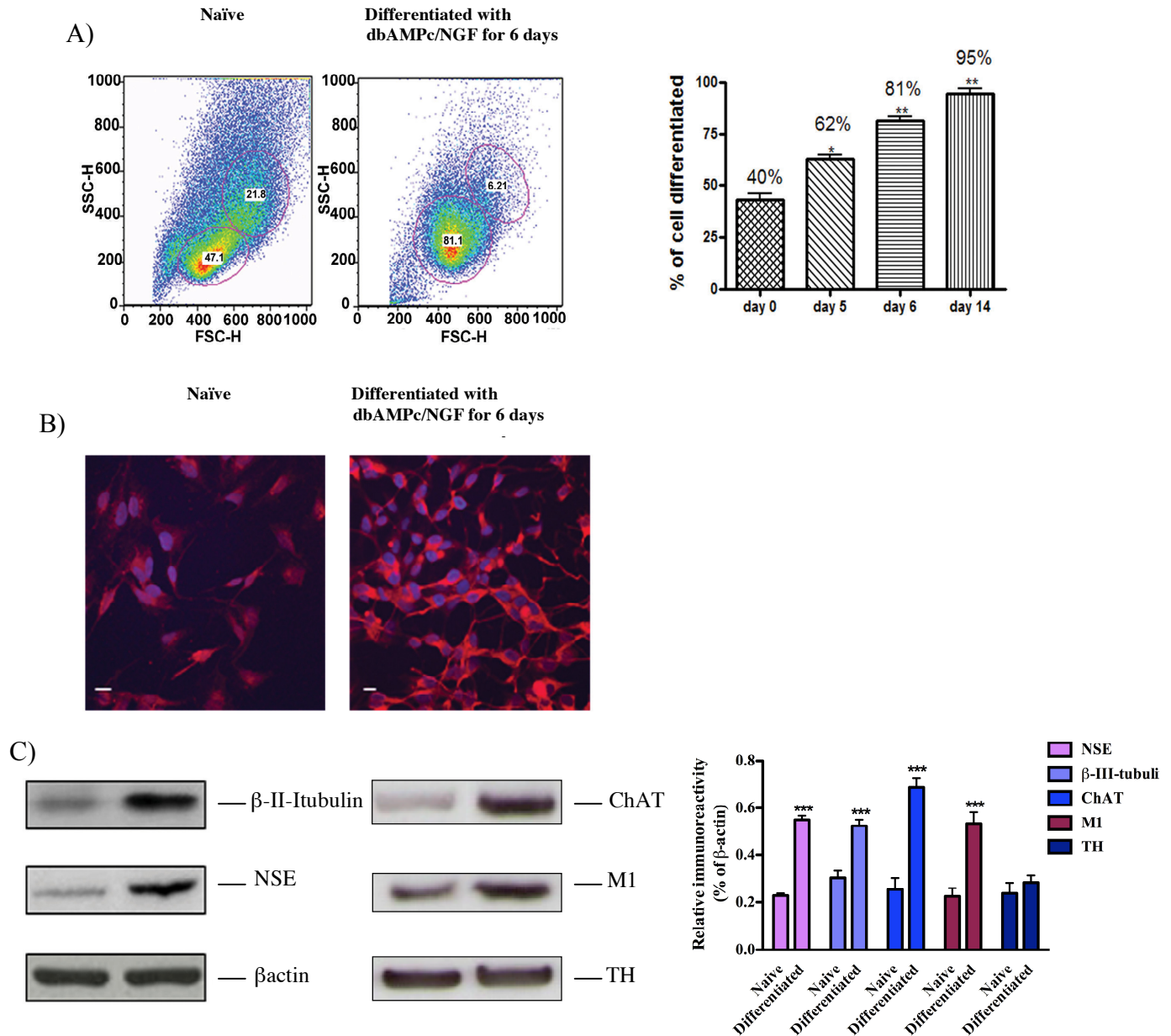
In una serie preliminare di studi, noi abbiamo ottimizzato condizioni di coltura che inducessero il differenziamento della linea cellulare umana SH-SY5Y così da ottenere una popolazione omogenea caratterizzata da un fenotipo neuronale maturo. La fig.11 mostra l'analisi citofluorimetrica, prima e dopo 6 giorni di differenziamento con il protocollo NGF-dbcAMP-N2. A tempi diversi di trattamento, le cellule sono state raccolte, colorate con 7-aminoactinomicina D (7-AAD) ed analizzate per citofluorimetria a flusso. Al giorno 0 la linea di neuroblastoma presenta due popolazioni eterogenee, che sono differenti sia per dimensioni che complessità interna (ved. Materiali e metodi). Dopo 6 giorni di trattamento con NGF-dbcAMP, è evidente un'unica popolazione delle due originarie (pari a circa l'81% del campione) la quale aumenta (fino a 100% del campione) protrahendo ulteriormente i giorni di incubazione (14 giorni, dati non mostrati). I risultati ottenuti, grafitando la percentuale di differenziamento rispetto ai giorni di trattamento, sono riportati nell'istogramma (fig11-A). Tali cambiamenti, espressi in FSC verso SSC, non sono attribuibili a differenti effetti apoptogenetici tossici esercitati dal dbcAMP/NGF, poiché in parallelo la colorazione delle cellule con 7-AAD non rivela differenze rispetto alle cellule non trattate nella percentuale di cellule 7-AAD positive (dati non mostrati).

Come mostrato nella fig.11-B l'immunofluorescenza con un anticorpo diretto contro il neurofilamento di 200-KDa (NF-200), noto marcatore neuronale, indica che le cellule esibiscono una progressiva riduzione del dimensione del soma accompagnata ad un aumento della lunghezza dei processi neuritici, indicando così l'acquisizione di un fenotipo simile a quello dei neuroni primari.

Nessuna crescita neuritica è osservata nelle cellule non trattate. Successivamente sono stati analizzati estratti proteici totali, sia delle cellule di controllo che di quelle differenziate, valutando l'espressione di specifici marcatori neuronali. In particolare le cellule differenziate esprimono livelli più alti sia di  $\beta$ -III-tubulina che di enolasi neurone-specifica (NSE) (fig.11-C), due specifici marcatori neuronali (Ferreira and Canceres, 1992). Inoltre, analizzando tali estratti anche con un anticorpo diretto contro l'enzima ChAT (Colina Acetil Transferasi) ed uno diretto contro il recettore colinergico M1, si

osserva che questa linea cellulare non solo acquista un fenotipo neuronale maturo in seguito al differenziamento, ma esprime anche livelli piu' elevati di questi due specifici marcatori dei neuroni colinergici (fig11-C) in assenza di variazione dei livelli di tirosina idrossilasi (Zuchner et al., 2004; Pongrac et al., 1998).

Fig.11



### Il differenziamento delle cellule umane SY5Y con dbAMPc/NGF promuove un fenotipo neuronale maturo

Le cellule SY5Y trattate con dbAMPc/NGF vengono analizzate mediante un saggio citofluorimetrico (1A), mediante immunofluorescenza con l'anticorpo NF200 (1B) e mediante Western blotting (1C) utilizzando gli anticorpi per la  $\beta$ -III tubulina e l'enolasi neurone-specifica, due marcatori specifici del differenziamento neuronale, e gli anticorpi per il recettore colinergico M1, per l'enzima ChAT (Colina Acetil Transferasi) e per l'enzima Tirocina Idrossilasi (TH). **A)** Analisi citofluorimetrica: le cellule vengono raccolte, colorate con la 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) ed analizzate per citofluorimetria a flusso. Come è possibile vedere, al giorno 0 (*naïve*) la linea cellulare di neuroblastoma presenta due popolazioni eterogenee che sono differenti per dimensioni e complessità interna. Dopo 6 giorni di trattamento con dbAMPc/NGF (*differentiated*), solo una delle due sub-popolazioni compare (81% del campione) la quale aumenta (100% del campione) protrando i giorni di incubazione (14 giorni, dati non mostrati). I risultati ottenuti graficando la percentuale di differenziamento rispetto ai giorni di trattamento sono riportati nell'istogramma (fig. A pannello di destra). Dunque, il trattamento con dbAMPc/NGF induce l'espansione di un sottopopolazione più grande rappresentante la quota parte di cellule di neuroblastoma maggiormente differenziate. I valori del differenziamento sono espressi come percentuale rispetto alle cellule di controllo (*naïve-day 0*) e ciascun punto sperimentale è la media  $\pm$  S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. La significatività statistica è calcolata mediante analisi della varianza one-way (ANOVA) seguita dal test di Dunnet per comparazioni multiple (\*\*  $p < 0,01$ ). **B)** Immunofluorescenza delle cellule SY5Y trattate (*differentiated*) e non trattate (*naïve*) per 6 giorni con dbAMPc/NGF e marcate con un anticorpo che rivela il neurofilamento NF-200 (1:100) quale marcatore neuronale. I nuclei sono marcati con Hoechst 33258 (0.5 mg/ml). Le cellule SY5Y non differenziate sono circolari con pochi processi neuritici. In seguito al trattamento con dbAMPc/NGF le cellule acquisiscono un fenotipo neuronale. *Scale bar*: 10 $\mu$ m. **C)** Un Western blotting rappresentativo, mostra che le cellule differenziate esprimono livelli più alti sia di  $\beta$ -III-tubulina che di enolasi neurone-specifica (NSE), due specifici marcatori neuronali. Inoltre, analizzando tali estratti anche con un anticorpo diretto contro l'enzima ChAT (Cholin Acethyl Transferase) ed uno diretto contro il recettore colinergico M1, si osserva che questa linea cellulare non solo acquista un fenotipo neuronale maturo in seguito al differenziamento, ma esprime anche livelli più elevati di questi due specifici marcatori dei neuroni colinergici, mentre il livello di espressione della tirocina idrossilasi rimane invariato tra le cellule *naïve* e quelle differenziate.

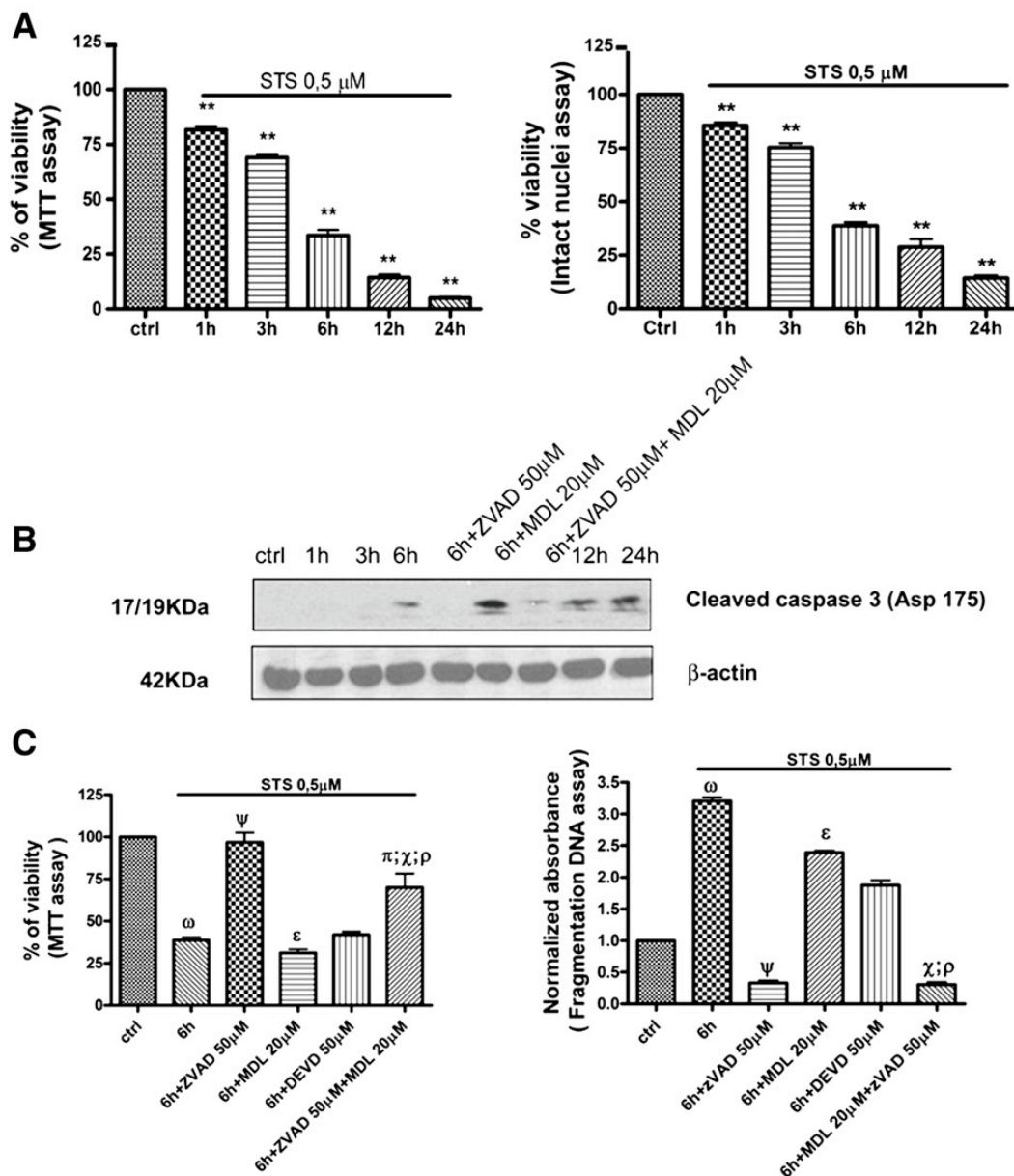
I valori densitometrici sono normalizzati utilizzando la  $\beta$ -actina come controllo interno. L'istogramma mostra le analisi densitometriche espresse come la media  $\pm$  S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. La significatività statistica è calcolata mediante il test di Student (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

## ***L'apoptosi indotta dalla staurosporina e' bloccata da un inibitore ad ampio spettro delle caspasi***

E' stato dimostrato che la staurosporina causa morte cellulare per apoptosi in vari paradigmi sperimentali, attivando sia la calpaina-I che le caspasi (Boix et al.,1997; Neumar et al.,2003) con modalità analoga a quanto si verifica in numerosi disordini neurodegenerativi, quali l'AD (Peraus et al.,1997; Zhao et al.,2003). Poiche' la proteina tau stessa e' substrato di entrambe tali proteasi (Canu et al., 1998; Park and Ferreira, 2005; Gamblin et al.,2003), le cellule SY5Y differenziate per 6 giorni vengono trattate con la staurosporina a differenti concentrazioni e, dopo 1, 3, 6, 12 e 24 ore, e' stata stimata la vitalita' cellulare sia mediante il saggio MTT che mediante la conta dei nuclei intatti. Inoltre, e' stata analizzata per Western blotting l'attivazione temporale della caspasi-3 monitorando, mediante un anticorpo che riconosce i livelli endogeni della caspasi-3 attiva formatasi in seguito al suo taglio in prossimita' dell'acido aspartico 175, la comparsa del frammento di 17/19 KDa. L'attivazione della calpaina-I indotta dalla staurosporina e' stata invece verificata utilizzando un anticorpo che reagisce contro il frammento di 58 KDa di tale proteasi (fig.15). Infine, sono stati valutati gli effetti neuroprotettivi di selettivi inibitori delle proteasi apoptotiche sulle cellule SY5Y trattate con staurosporina, utilizzando un saggio che rileva la frammentazione oligonucleosomale del DNA. Come riportato in fig.12 la perdita di vitalita' delle cellule SY5Y trattate con staurosporina e':

- i) tempo dipendente, in quanto e' proporzionale alla durata dell'insulto apoptotico
- ii)temporalmente associata alla comparsa del frammento di 17/19 KDa, indice dell'attivazione della caspasi-3 (fig12-B)
- iii) e' ridotta dall'inibitore ad ampio spettro delle caspasi Z-VAD-fmk, ma non dall'inibitore della calpaina MDL28170 (fig12-C).

Fig.12



**La staurosporina induce una morte cellulare apoptotica che coinvolge l'attivazione della(e) caspasi e della calpaina I**

A) Le cellule differenziate SY5Y sono incubate in presenza di staurosporina ad una concentrazione di 0.5 μM per i tempi indicati. La morte cellulare è determinata mediante il saggio MTT, espresso come OD 570/620, e mediante la conta dei nuclei intatti. Ogni punto sperimentale è la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. I valori sono riportati in percentuale e normalizzati rispetto a quelli relativi alle cellule non trattate (Ctrl), considerati pari a 100 (\*\*p<0.01). La significatività statistica è calcolata mediante analisi della varianza one-way (ANOVA) seguita dal test di Dunnett per comparazione multiple (\*\* p<0,01). B) Analisi proteica per Western blotting della caspasi 3 attiva (1:1000) in estratti totali di cellule SY5Y differenziate (ctrl) e trattate con staurosporina 0.5 μM e sia con Z-VAD-fmk (50μM) o con MDL 28170 (20μM) o con entrambi. Gli inibitori delle caspasi e della calpaina I sono aggiunte 1h prima del trattamento con staurosporina, dopodiché le cellule vengono trattate con staurosporina per ulteriori 6 ore. I valori densitometrici sono normalizzati utilizzando la β-actina come controllo interno. E' da notare che l'anticorpo utilizzato è diretto solo verso il sito di taglio Asp175 della caspasi-3 e non rivela forme di altre caspasi (come caspasi-2, caspasi-6 o caspasi-7), che potrebbero essere già attive a 3 ore ed essere responsabili del taglio precoce di tau e della produzione del frammento di tau di 20-22 kDa. C) La vitalità cellulare viene determinata mediante il saggio MTT (espresso come OD 570-620) o mediante un saggio che determina la frammentazione oligonucleosomale del DNA nelle cellule differenziate (controllo) e in quelle trattate con STS 0.5μM per 6 ore in presenza o assenza degli inibitori ZVADfmk (50μM), DEVD (50μM), MDL28170 (20μM) o di entrambi. Ogni punto sperimentale è la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. I valori sono riportati in percentuale e normalizzati rispetto a quelli relativi alle cellule differenziate non trattate (Ctrl), considerati pari a 100% o 1. La significatività statistica è calcolata mediante il test t-Student ( $\omega$ : 6h vs ctrl\*\*\*p<0.001;  $\psi$ : ZVADfmk vs 6h \*\*\*p<0.001-\*\*p<0.01;  $\epsilon$ : MDL28170 vs 6h \*\*\*p<0.001;  $\pi$ : ZVADfmk+MDL28170 vs ZVADfmk \*p<0.05;  $\chi$ : ZVADfmk+MDL28170 vs MDL28170 \*p<0.05-\*\*\*p<0.001;  $\rho$ : ZVADfmk+MDL28170 vs 6h\*p<0.05-\*\*\*p<0.001).

### ***Il frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa e' generato durante apoptosi neuronale***

Come mostrato in fig.13-A l'induzione dell'apoptosi porta alla comparsa di un frammento riconosciuto dall'anticorpo NH<sub>2</sub>-CCP-NH<sub>2</sub> tau di 20-22 kDa, peso molecolare atteso per la forma tronca di tau corrispondente alla sequenza aminoacidica NH<sub>2</sub> 26-230 aa. Nessuna banda di comparabile intensita' e' rivelata invece nelle cellule di controllo non trattate. Il livello di immunoreattivita' del frammento di tau di 20-22 kDa aumenta in modo tempo-dipendente e, dopo 12 ore di trattamento con staurosporina, il suo livello e' di circa 15-20 volte piu' elevato rispetto alle cellule di controllo non trattate (fig13-H). Ne' la tubulina (dati non mostrati) ne' l'actina vanno incontro a simili cambiamenti (fig13-G). E' da notare che l'anticorpo utilizzato in fig. 13-A e' stato pre-assorbito per cromatografia di affinita' esponendolo alla proteina intera di tau (Rohn et al.,2002). Come mostrato con l'anticorpo fosforilazione indipendente tau-5, che riconosce tutte le varianti umane della proteina, non vi e' alcuna significativa cross-reazione anticorpale verso la forma intera della proteina tau (fig.13-B), nonostante tali isoforme siano contestualmente presenti. Per confermare l'identita' del frammento di tau di 20-22 kDa, e' stata poi condotta una mappatura immunologica, ibridando le membrane con diversi anticorpi diretti contro differenti siti di tale frammento. Come mostrato in fig.13 il frammento di tau di 20-22 kDa, non e' solamente rilevato ibridando con l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub> tau (fig.13-A), ma anche con gli anticorpi tau-5 (fig.13-B) e tau-1 (fig.13-C). Di converso, nessuna immunoreattivita' e' rilevata con gli anticorpi C-17 (fig.13-E) o tau-13 (fig.13-F), che sono anticorpi diretti rispettivamente contro le estremita' estreme carbossi-terminale ed amino-terminale della proteina tau umana. Tale frammento e' anche rilevato utilizzando altri due anticorpi umano-specifici, diretti contro il dominio amino-terminale della proteina tau, tau-21 e HT7, che riconoscono rispettivamente gli epitopi 21-36 e 159-163, ma non e' rilevato da T-46, un anticorpo diretto contro l'estremita' carbossi-terminale piu' distale di tau (dati non mostrati). Tali evidenze confermano ulteriormente l'identita' del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa, che mappa all'interno dei limiti degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi tau-21 e tau-5. E' stata inoltre testata la presenza del frammento di tau in un altro ben stabilito modello apoptotico di morte neuronale di tipo AD, ovvero i neuroni corticali e ippocampali trattati per 24 ore con 10µM di peptide beta amiloide pre-aggregato (Gamblin

et al., 2003; Park and Ferreira, 2005). In tale paradigma sperimentale, l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub> tau rileva un frammento di peso molecolare 20-22 kDa, in correlazione con una significativa riduzione della sopravvivenza cellulare ed un aumento della regolazione dell'attività delle caspasi (dati non mostrati).

Comparando l'andamento temporale della degradazione di tau rispetto alla sua fosforilazione, e' possibile notare che il taglio proteolitico di tau e' associato alla sua concomitante defosforilazione all'epitopo tau-1 (comparare fig.13-C e 13-D) ed e' inoltre correlato ad un aumento dei neuroni apoptotici. Tuttavia l'immunoreattività rilevata con l'anticorpo tau -1 (fig.13-C) sembra essere dovuta ad:

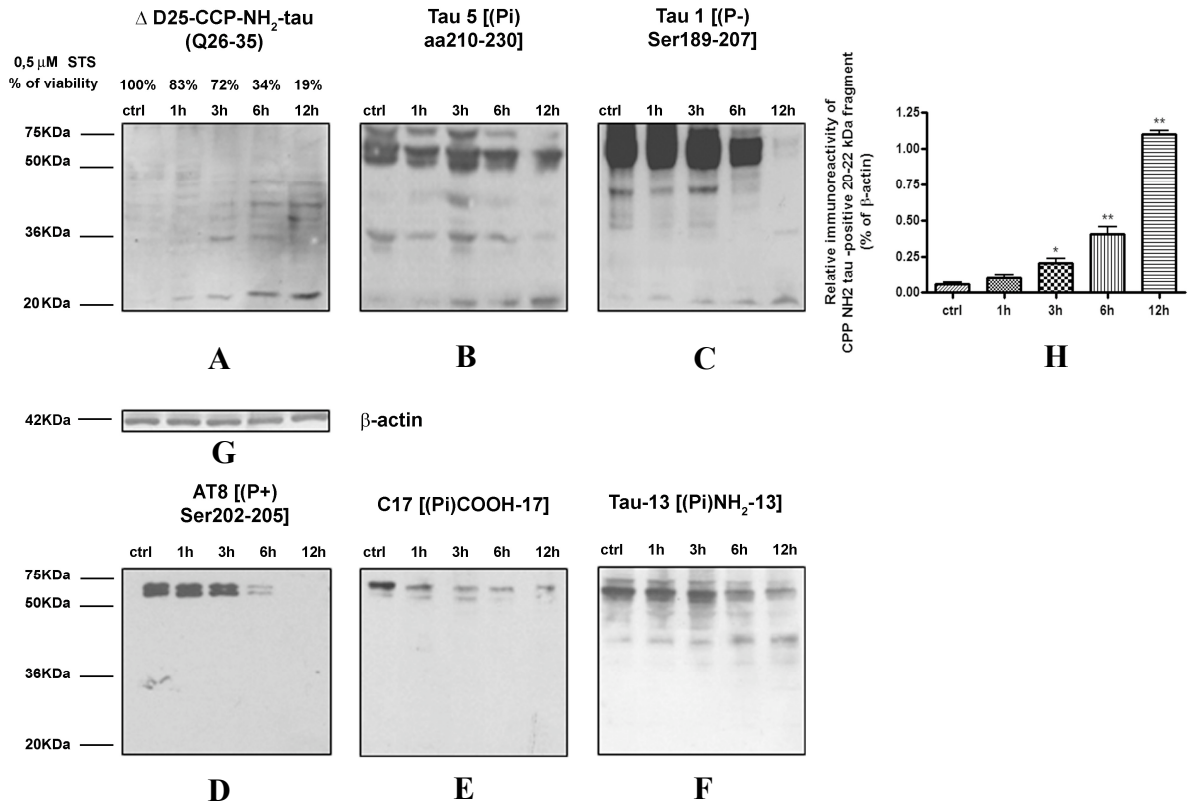
- i) una generale riduzione della quantità di tau causata dal taglio proteolitico, come anche confermato dall'anticorpo fosforilazione indipendente tau-5 che rivela il livello totale di tau (fig.13-B)
- ii) una parallela diminuzione dello stato fosforilativo, come evidenziato comparando il progressivo laddering di immunoreattività rilevato dall'anticorpo tau-1 (fig.13-C) e la concomitante diminuzione dell'immunoreattività dell'anticorpo AT8 (fig.13-D).

Come menzionato gli anticorpi tau-1 e AT8 sono complementari, poiché riconoscono epitopi che si sovrappongono ma in differenti stati di fosforilazione. E' da notare inoltre che il frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa non e' rilevato utilizzando l'anticorpo fosforilazione-dipendente AT8 nonostante esso sia già presente dopo 1-3 ore dal trattamento con staurosporina, suggerendo che tale frammento è defosforilato a tali residui. Come sarà discusso successivamente, tali dati sono in accordo con precedenti evidenze sperimentali che indicano una diretta correlazione tra la misura dello stato di fosforilazione di tau e la sua vulnerabilità al taglio proteolitico da parte delle proteasi cellulari.

Per valutare la distribuzione sub-cellulare del frammento N-terminale di tau, sono stati poi fatti studi di immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub> tau. Come mostrato in fig.14-B nei neuroni SY5Y trattati con staurosporina, il segnale di immunoreattività e' distribuito attraverso tutto il corpo cellulare (freccette), estendendosi anche ai neuriti (vedere il pannello in dettaglio) con l'avanzare della morte neuronale. Tale distribuzione e' già visibile dopo un'ora di trattamento con staurosporina (dati non mostrati) ed aumenta successivamente, mentre nei neuroni SY5Y di controllo non e' evidenziata alcuna colorazione di comparabile intensità (fig.14-A). In aggiunta, nessuna

colorazione e' rilevata omettendo l'anticorpo primario (dati non mostrati). Infine, l'aumento tempo-dipendente dell'immunoreattivita' di CCP-NH<sub>2</sub> tau correla con una concomitante frammentazione della cromatina e con un aumento del numero dei nuclei apoptotici Hoechst-positivi.

Fig13

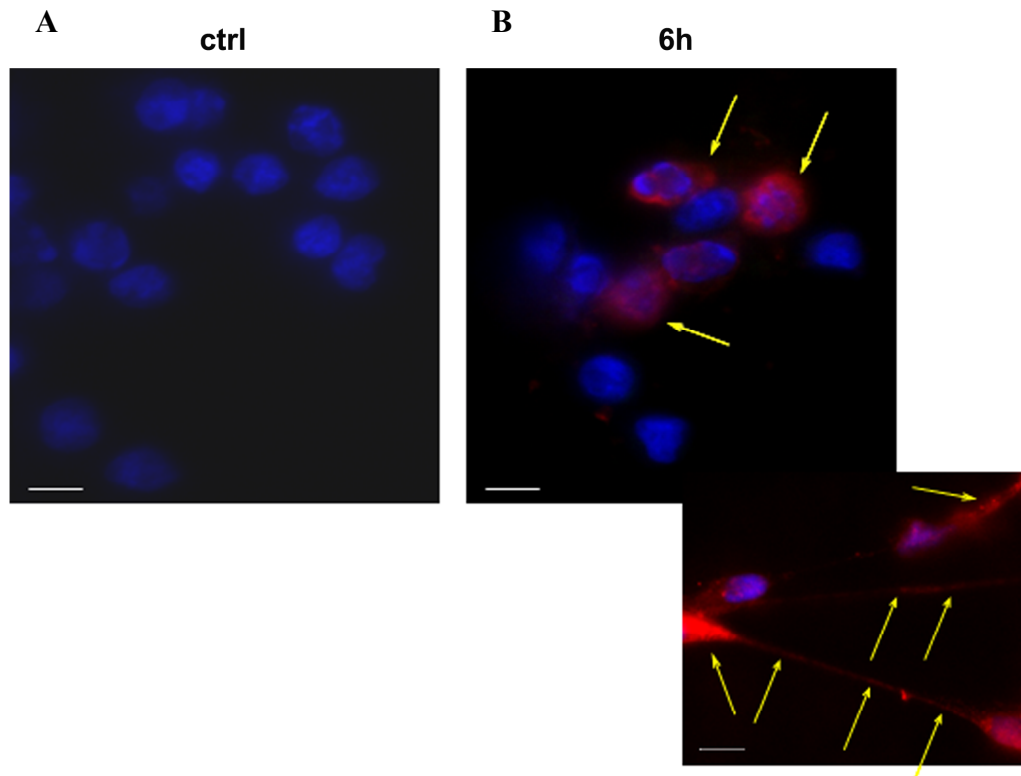


**L' apoptosi neuronale nelle SY5Y trattate con STS induce il taglio amino-terminale di tau e la defosforilazione con la generazione del frammento di 20-22 kDa di tau.**

Gli estratti proteici totali delle cellule SY5Y differenziate non trattate (ctrl) o trattate con STS 0.5 μM a tempi differenti sono ibridati con l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub>-tau (A) diretto contro la sequenza umana di tau NH<sub>2</sub>-DRKD<sub>25</sub>-QGGYTMHQDQ. L'anticorpo pre-assorbito CCP-tau riconosce il frammento tagliato dalla caspasi-3, ma non riconosce la forma intera di tau (Rohn et al., 2002). La banda di 20-22 kDa positiva per CCP-NH<sub>2</sub>-tau visualizzata in fig.13-A e' normalizzata usando la β-actina come controllo interno e i valori densitometrici sono riportati in fig.13-H. Ogni punto sperimentale e' la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti. La significativita' statistica e' calcolata mediante analisi della varianza one-way (ANOVA) seguita dal test di Dunnet per comparazione multiple (\*p<0,05; \*\* p<0,001). Pari ammontari di proteina sono caricati su gel e le membrane sono ibridate con (i) l'anticorpo tau-5 fosforilazione-indipendente (aa 210-230) che rivela i livelli di tau totale indipendentemente dallo stato di fosforilazione (indicato come Pi) e riconosce sia le isoforme *full-length* di tau sia il frammento amino-terminale tagliato dalle caspasi(B), con (ii) l'anticorpo tau-1 fosforilazione-dipendente (indicato come P-) (C) e con (iii) l'anticorpo complementare AT8 fosforilazione-dipendente (indicato come P+) (D), con (iv) C17 (COOH-17)(E) e (v) tau-13 (NH<sub>2</sub>-13)(F). Questi ultimi due anticorpi rivelano le estremita' carbossi e aminoterminali di tau rispettivamente. E' da notare che il frammento di 20-22 kDa di tau viene visualizzato con gli anticorpi CCP-NH<sub>2</sub>-tau, tau-1, tau-5 ma non dagli anticorpi C17 e tau-13, indicando che tale frammento manca dei relativi epitopi riconosciuti da tali anticorpi.



Fig.14



**La troncazione amino-terminale di tau e' evidente nei neuroni apoptotici umani.**

La precoce degradazione amino-terminale e' evidente nelle cellule SY5Y differenziate per 6 giorni e trattate con STS 0.5  $\mu$ M (B). Al tempo indicato le cellule sono fissate e marcate sia con l'anticorpo NH<sub>2</sub>-CCP-tau (rosso) e con Hoechst 33258 (blu). Le frecce indicano l'aumento di marcatura rilevato con l'anticorpo NH<sub>2</sub>-CCP-tau distribuito in tutto in citoplasma e che si estende nei neuriti dei neuroni Hoechst-positivi dopo il trattamento con STS. La frammentazione della cromatina e' evidente nei neuroni NH<sub>2</sub>-CCP-tau-positivi. Nessuna colorazione di comparabile intensita' e' evidente nelle cellule di controllo con trattate (A) o omettendo l'anticorpo primario (dati non mostrati). E' riportata esclusivamente l'immagine relativa ad un esperimento rappresentativo di tre. *Scale bar*: 10 $\mu$ M.

### ***Identificazione delle proteasi responsabili della produzione del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa***

Poiche' nel dominio N-terminale di tau ci sono diversi siti consenso per il taglio di caspasi e calpaine (Canu et al., 1998), le cellule umane SY5Y sono state trattate con selettivi inibitori di proteasi prima di essere esposte alla staurosporina (Neumar et al., 2003) e, dopo differenti ore di incubazione, è stata saggiata sia la vitalità cellulare che l'immunoreattività di CCP-NH<sub>2</sub> tau, della caspasi 3 attiva e della calpaina 1 attiva. Come mostrato in fig.15-A l'inibizione delle caspasi, mediante l' inibitore ad ampio spettro Z-VAD-fmk utilizzato ad una concentrazione finale di 50µM, ma non mediante l'inibitore selettivo della caspasi-3 DEVD-CHO (dati non mostrati), riduce nettamente la morte neuronale valutata per saggio MTT. Al contrario l'inibizione della calpaina I, mediante l'utilizzo del farmaco selettivo MDL28170, non è in grado di ridurre la morte cellulare (fig.15-A). Tali evidenze suggeriscono che l'attivazione delle caspasi è predominante e sufficiente in questo modello di apoptosi neuronale. In seguito sono stati analizzati gli estratti proteici totali di neuroni trattati per 6 ore con staurosporina, con o senza pretrattamento con gli inibitori delle proteasi e delle caspasi. Il trattamento con l'inibitore generale Z-VAD-fmk previene l'attivazione della caspasi-3 (fig.15-C), così come la comparsa del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa (fig.15-B). È da notare che l'intensità di segnale del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa diminuisce in seguito al pre-trattamento con Z-VAD-fmk, sebbene il prodotto proteolitico finale è ancora debolmente presente probabilmente in seguito all'incompleta inibizione delle caspasi o all'attivazione di altre proteasi cellulari. Al contrario, il trattamento con MDL28170, o il trattamento combinato di Z-VAD-fmk con MDL28170 non sono in grado di bloccare la morte cellulare, come mostrato in fig.15-A, né di prevenire il taglio proteolitico di tau all'N-terminale (fig.15-B). L'effetto combinato dei due inibitori, Z-VAD-fmk e MDL28170, non riduce né la morte neuronale, né la formazione del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa poiché, come già riportato, l'inibizione della calpaina in questo modello neuronale induce l'attivazione della cascata delle caspasi (fig.15-C). L'analisi densitometrica dell'immunoreattività del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa in seguito ai trattamenti farmacologici è mostrata in fig.15-B'.

Per confermare ulteriormente l'attivazione della cascata delle caspasi in tale modello di apoptosi, gli estratti proteici totali dei neuroni trattati con staurosporina sono stati

analizzati con due differenti anticorpi che rivelano i neoepitopi generati dopo il taglio delle caspasi al C-terminale della proteina tau (Asp 421) e al C-terminale della proteina precursore amiloide (APP) (Asp664). In letteratura ci sono diverse evidenze che suggeriscono che tali proteine neuronali sono coinvolte nella patogenesi dell'AD e che, quando tagliate all'estremità C-terminale da tali proteasi, acquisiscono funzioni neurotossiche, (Zhao et al., 2003; Saganich et al., 2006; Gamblin et al., 2003; Rissman et al., 2004).

La fig.15 mostra che il pre-trattamento dei neuroni apoptotici con ZVAD-fmk, ma non con MDL28170, previene l'attivazione della caspasi 3 (fig.15-C) così come la comparsa del frammento di 65kDa generato dal taglio delle caspasi all'estremità C-terminale della proteina tau (fig.15-E). In aggiunta il frammento di 35 kDa, generato dal taglio delle caspasi all'estremità C-terminale della proteina APP (fig.15-F), scompare dopo pre-incubazione con Z-VAD-fmk. Risultati simili sono stati poi ottenuti mediante esperimenti di immunofluorescenza (fig.15-G-H). Tutte questi dati sperimentali evidenziano, in questo modello neuronale, il frammento N-terminale della proteina tau 25-230 e' generato dal taglio delle caspasi.

E' stata verificata inoltre la comparsa del frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa in altri due modelli neuronali di morte cellulare, le cellule PC12 differenziate con NGF (Greene 1978; Pittman et al.,1993) e le cellule di neuroblastoma umano SY5Y differenziate con acido retinoico e BDNF (Encinas et al.,1999; Encinas et al.,2000) ed indotte in apoptosi caspasi-mediata, mediante rimozione dal mezzo di coltura della rispettiva neurotrofina. La fig 16A-B riporta l'analisi mediante Western blotting degli estratti proteici dopo 48h di apoptosi ibridati con l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub> tau. Come mostrato, la rimozione della specifica neurotrofina induce, in entrambi i modelli apoptotici, un significativo aumento del frammento di 20-22 kDa CCP-NH<sub>2</sub>-positivo in correlazione con significativa riduzione della sopravvivenza cellulare, valutata mediante saggio MTT (dati non mostrati).

Al fine di determinare se il frammento N-terminale di 20-22kDa di tau si generasse anche *in vivo* in un modello animale di neurodegenerazione indotta dalla deprivazione di NGF, sono stati comparati, mediante analisi per Western blotting con l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub> tau, gli estratti proteici di ippocampo tra topi di controllo e topi transgenici anti-NGF (topi AD11 di 15 mesi di età. I topi AD11, che esprimono anticorpi anti-NGF (Capsoni et al., 2000), sviluppano una progressiva neurodegenerazione dipendente dall'età che e'

altamente simile a quella caratterizzante l' AD. Tali topi mostrano con l'età un fenotipo neurodegenerativo con deficits comportamentali correlati con l'atrofia colinergica, perdita neuronale, iperfosforilazione ed insolubilità di tau, cambiamenti citoscheletrici simili a quelli rivelati nei PHF (Capsoni et al., 2000), placche  $\beta$ -amiloide (Capsoni et al., 2002a,b), e diminuzione della plasticità sinaptica corticale (Pesavento et al., 2002). In aggiunta, la progressione della neurodegenerazione determina una perdita delle funzioni colinergiche della regione CA3-CA1 dell'ippocampo causando l'insorgenza di alterazioni funzionali, quali la diminuita plasticità ippocampale (Sola et al., 2006).

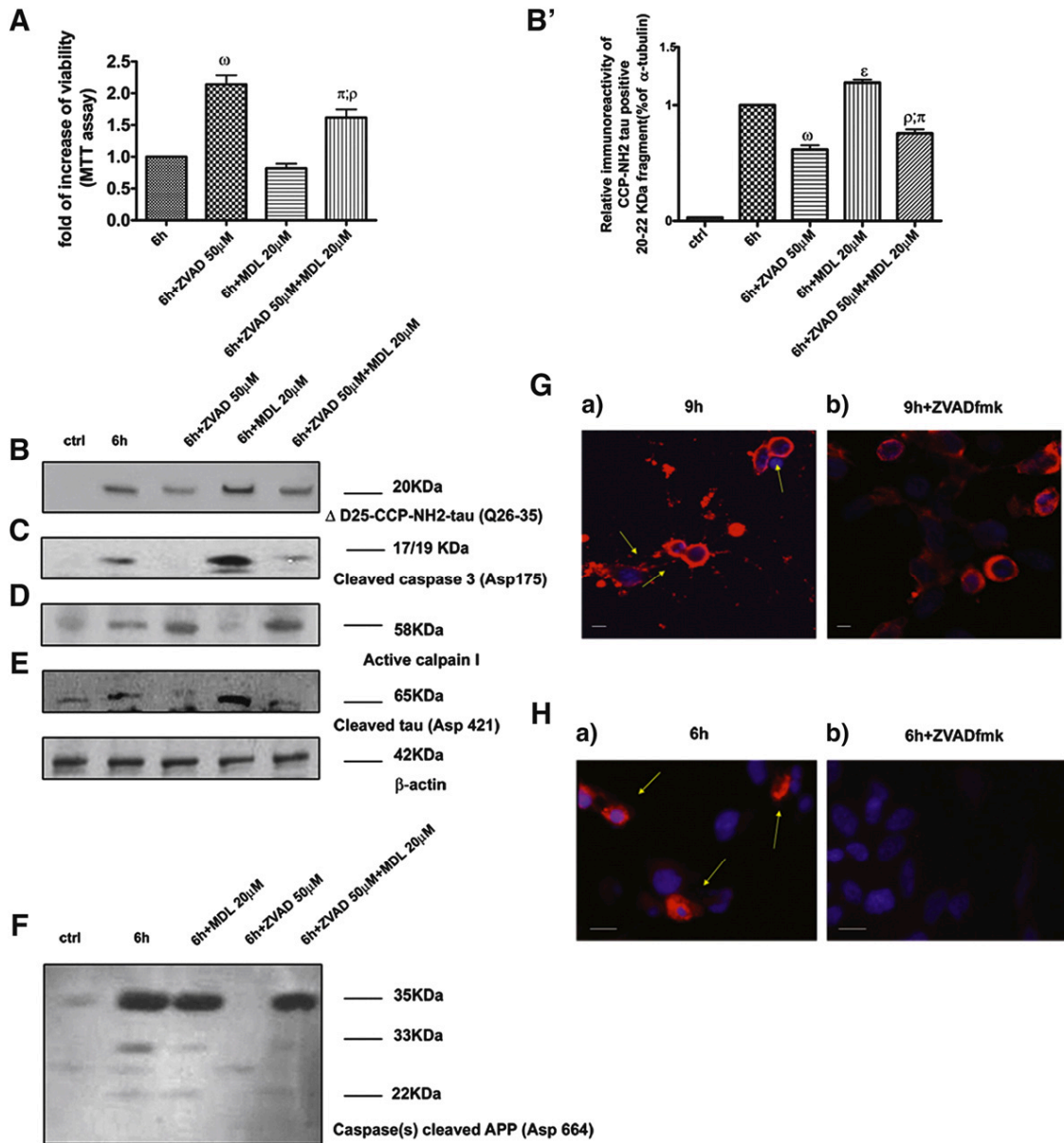
Gli omogenati proteici di ippocampo sono analizzati per Western blotting utilizzando antisiero CCP-NH<sub>2</sub> tau e l'anticorpo diretto contro la caspasi-3 attiva. Come mostrato in fig 16-C, un frammento N-terminale di tau di 20-22kDa, con mobilità elettroforetica simile a quella osservata per le colture cellulari, viene visualizzato nell'ippocampo dei topi transgenici AD11 e la sua comparsa è correlata con un significativo aumento della attività delle caspasi. Al contrario nessuno livello significativo di espressione, sia del frammento N-terminale di tau che della caspasi attiva, è rilevato nei topi wild-type come mostrato dall'analisi densitometrica riportata in fig.16-E. In aggiunta nessuno dei cambiamenti sopra indicati è visibile a livello della corteccia cerebrale, confrontando i topi transgenici AD11 rispetto a quelli di controllo (dati non mostrati).

Come riportato in fig.16, l'analisi per immunohistochimica dell'ippocampo dei topi transgenici AD11 di 15 mesi conferma la presenza del frammento N-terminale di tau, così come la presenza della caspasi-3 attiva nei neuriti distrofici (freccie) (fig.F-H). Nella fig.16-F-H è mostrato che tali neuriti sono principalmente localizzati nello strato radiale e lacunoso-molecolare della regione CA1 e CA2 dell'ippocampo. Nessuna specifica colorazione è osservata invece nei topi di controllo (fig.G-I)

Nei topi AD11, la caspasi-3 attiva viene osservata non solo nei neuriti distrofici ma anche negli interneuroni e nelle cellule piramidali della regione CA1 (fig.H). Nei topi di controllo invece è presente solo una piccola percentuale di neuriti distrofici (fig.I).

In accordo con questi dati, Rohn e collaboratori (2002) hanno riportato che l'anticorpo NH<sub>2</sub>-CCP tau rivela gli aggregati neurofibrillari ( *NFT*) e i neuriti distrofici nelle sezioni ippocampali umane di casi AD.

**Fig.15**

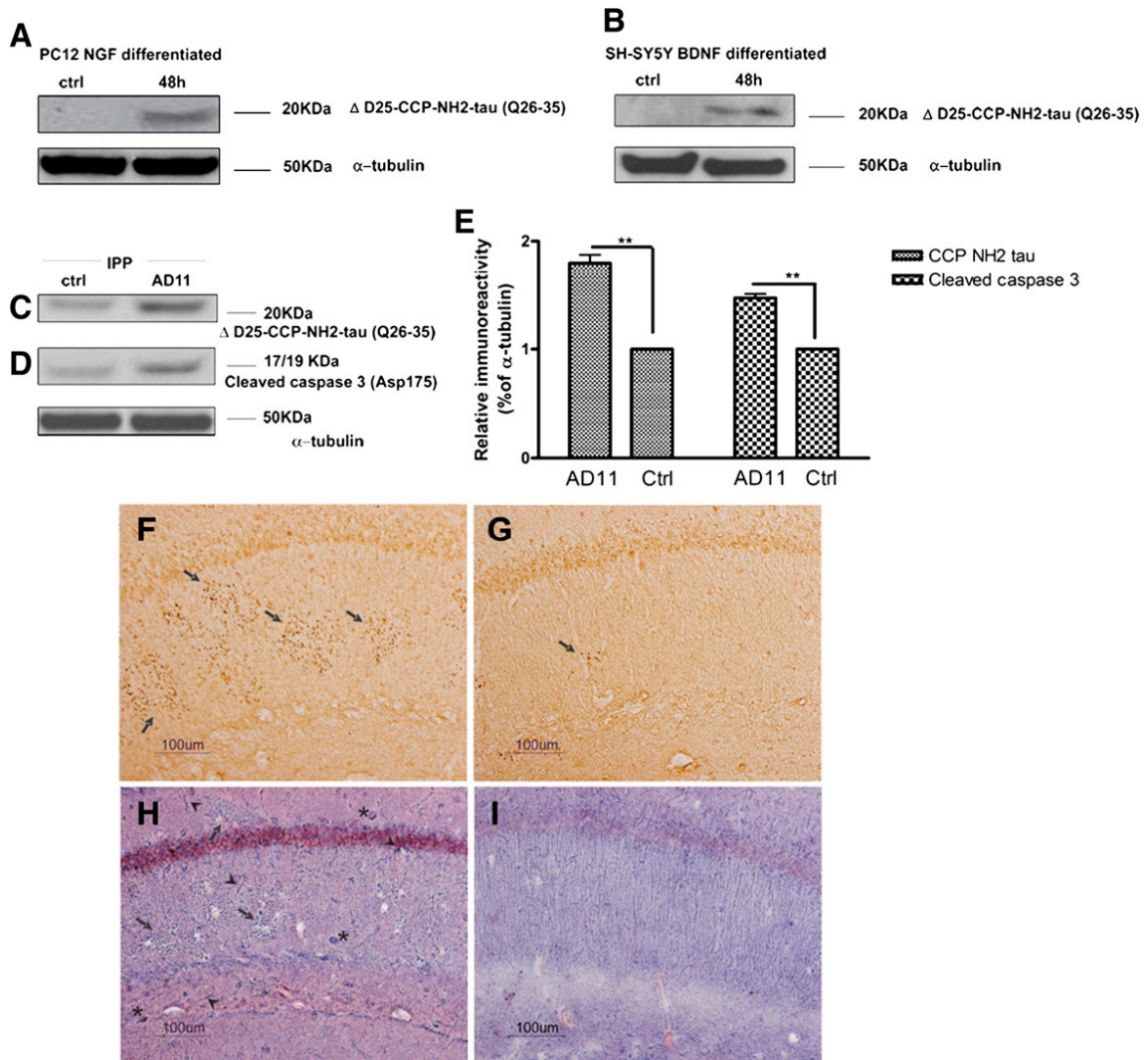


**Effetti degli inibitori delle caspasi e della calpaina I sulla generazione del frammento di 20-22 kDa di tau indotta dal trattamento con STS.**

Il coinvolgimento delle proteasi apoptotiche nel taglio amino-terminale di tau e' monitorato mediante analisi per Western blotting delle cellule SY5Y differenziate incubate in assenza o in presenza di STS 0.5  $\mu$ M per 6 ore e pre-trattate con o senza ZVADfmk (50 $\mu$ M), o con MDL28170 (20 $\mu$ M), inibitori selettivi delle caspasi e della calpaina I rispettivamente. Pari ammontari di proteina sono caricati su gel e le membrane sono ibridate con l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub>-tau (B), l'anticorpo per la caspasi-3 attiva (C), la calpaina I attiva (D), l'anticorpo diretto contro la tau tagliata all'aminoacido Asp 421(E) e l'anticorpo che reagisce con l'APP tagliato al sito Asp664(F). Il grafico (A) mostra l'aumento di vitalita' cellulare e la significativita' statistica e' calcolata mediante il test t-Student. Ogni punto sperimentale e' la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti ( $\omega$ :ZVADfmk vs 6h \*\*p<0.01;  $\rho$ :ZVADfmk+MDL28170 vs 6h \*p<0.05;  $\pi$ : ZVADfmk+MDL28170 vs ZVADfmk\*p<0.05 ). L'analisi densitometrica del frammento di 20-22 kDa di tau e' mostrata in fig.B' e la significativita' statistica e' calcolata mediante il test t-Student;

Ogni punto sperimentale e' la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di cinque esperimenti indipendenti ( $\omega$ : ZVADfmk vs 6h \*\*p<0.01;  $\epsilon$ : MDL28170 vs 6h \*p<0.05;  $\rho$ : ZVADfmk+MDL28170 vs 6h \*p<0.05;  $\pi$ : ZVADfmk+MDL28170 vs ZVADfmk \*\*\*p<0.001 ). G-H (a-b): le cellule SY5Y differenziate per 6 giorni sono trattate con STS 0.5  $\mu$ M con (b) o senza (a) Z-VAD-fmk. Ai tempi indicati le cellule vengono fissate e marcate con l'anticorpo CCP-NH<sub>2</sub>-tau (fig.G-rosso) o con l'anticorpo per l'APP tagliata dalle caspasi (fig.H-rosso) e con Hoechst 33258 (blu). E' da notare che le cellule positive per CCP-NH<sub>2</sub>-tau (freccie) mostrano segni di condensazione e frammentazione nucleare, come dimostrato dopo colorazione con Hoechst e che tale immunoreattivita' scompare in seguito al trattamento con Z-VAD-fmk. Scale bar: 10 $\mu$ m.

Fig.16



**Il frammento amino-terminale di tau di 20-22 kDa e' presente in modelli cellulari ed animali di neurodegenerazione mediata dalla privazione di neurotrofine.**

**A-B:** I western blotting rappresentativi mostrano che il frammento amino-terminale di tau di 20-22 kDa e' rilevato dall'anticorpo CCP-NH2-tau negli estratti apoptotici di PC12 differenziate con NGF e di cellule SY5Y differenziate con acido retinico/BDNF in seguito alla privazione per 48 ore di NGF e BDNF rispettivamente. L'α-tubulina e' utilizzata come controllo interno.

**C-D:** Il Western blotting rappresentativo mostra che il frammento amino-terminale di tau di 20-22 kDa e' presente nei topi transgenici AD11 di 15 mesi. Pari quantita' (100μg) di estratto proteico di ippocampo (IPP) sono caricate in ogni lane per ogni ceppo e separate mediante analisi elettroforetica, utilizzando un gel Tris-Tricina 10-16%. Dopo la corsa elettroforetica, le membrane sono ibridate con l'anticorpo CCP-NH2-tau e successivamente con un anticorpo diretto contro la caspasi-3 attiva. L'α-tubulina e' utilizzata come controllo interno.

**E:** L'intesita' di immunoreattivita' dell'anticorpo CCP-NH2-tau e di quello per la caspasi-3 attiva sono normalizzati rispetto all'α-tubulina che e' utilizzata come controllo interno. L'istogramma mostra l'analisi densitometrica: ogni punto sperimentale e' la media +/- S.E. di determinazioni in triplicato di tre esperimenti indipendenti per ogni gruppo ed e' riportata come percentuale rispetto alle cellule di controllo (=1). La significativita' statistica e' calcolata mediante il test t-Student (\*\*p<0.01).

**F-I:** Immunostochimica diretta contro il frammento di tau e la caspasi-3 attiva. (F) L'anticorpo diretto contro il frammento di tau marca clusters di neuriti distrofici (freccie) nell'ippocampo di topi AD11 di 15 mesi. (G) Pochi neuriti (freccie) distrofici sono visibili nell'ippocampo dei topi di controllo. (H) Nei topi AD11 di 15 mesi, l'anticorpo diretto contro la caspasi-3 attiva marca le cellule piramidali ippocampali, neuriti isolati ( punta delle freccia), clusters di neuriti distrofici (freccie) e interneuroni (asterischi) in tutte le regioni dell'ippocampo. (I) Nessuna significante marcatura e' rilevata nell'ippocampo dei topi di controllo. Scale bar: 100μm.

### ***Effetti del frammento NH<sub>2</sub>-26-44 di tau sul metabolismo energetico mitocondriale***

Precedenti lavori del nostro gruppo di ricerca (Amadoro et al., 2004; Amadoro et al., 2006) hanno dimostrato che un aumento dei livelli intracellulari di frammenti amino-terminali di tau privi dei primi 25aa evocano una morte da eccitotossicità da glutammato potente e rapida, che implica una stimolazione sostenuta e protratta dei recettori NMDA extra-sinaptici. L'analisi mutazionale ha inoltre dimostrato che il frammento di tau NH<sub>2</sub>-26-44 è la minima regione capace di indurre il marcato effetto neurotossico. Recenti studi condotti su cervelli postmortem di pazienti AD e su animali transgenici suggeriscono inoltre che la disfunzione mitocondriale, con conseguente perdita delle sinapsi, è uno dei possibili meccanismi attraverso il quale il peptide A $\beta$  causa neurodegenerazione (Reddy et al., 2008). Considerando pertanto che anche minime variazioni nella biodisponibilità a livello delle sinapsi di ATP significativamente alterano il rilascio extrasinaptico del neurotrasmettitore (Reddy et al., 2008), abbiamo deciso di verificare se anche i frammenti di tau NH<sub>2</sub>-26-44 e NH<sub>2</sub>-1-25, come il peptide A $\beta$ , potessero alterare alcuna delle funzioni mitocondriali neuronali.

A tal proposito, noi abbiamo esaminato negli omogenati di CGN tutti i passaggi che portano alla sintesi di ATP e al trasporto al di fuori dei mitocondri. Tali passaggi sono:

- a) Il trasporto dei substrati respiratori attraverso la membrana mitocondriale interna
- b) L'ossidazione dei substrati da parte di specifiche deidrogenasi
- c) Il flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria
- d) Generazione del  $\Delta\mu_{H^+}$  (gradiente protonico elettrochimico)
- e) Scambio ADP/ATP attraverso la membrana mitocondriale interna tramite il traslocatore ANT
- f)  $\Delta\mu_{H^+}$  guidato dalla sintesi di ATP mediante ATP sintetasi.

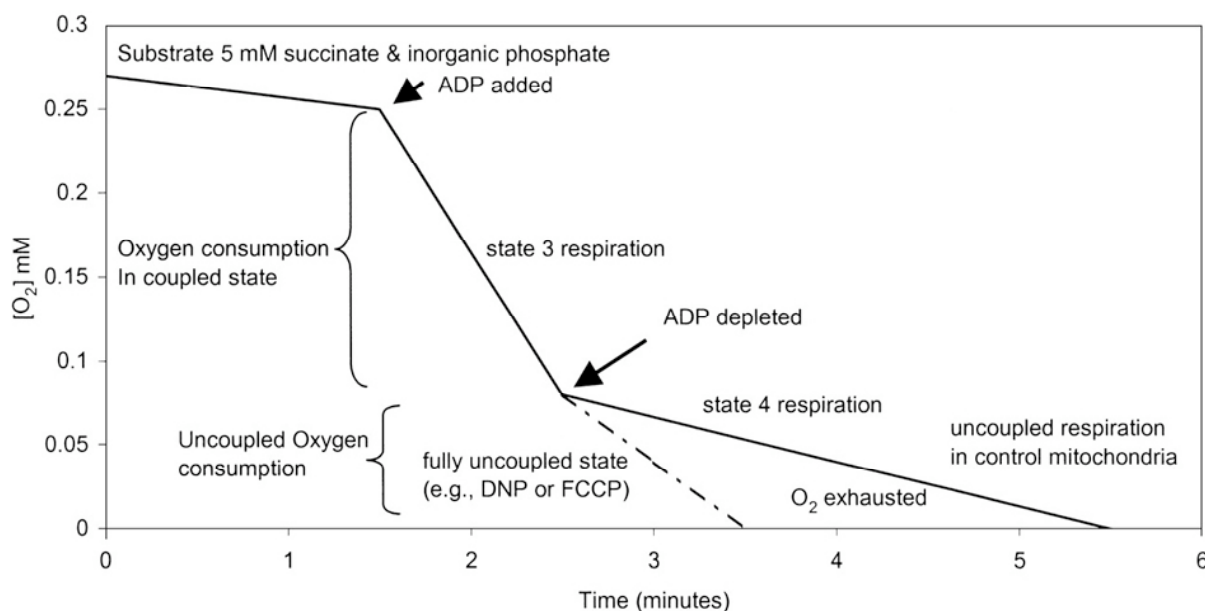
Dalle analisi effettuate risulta che i frammenti di tau NH<sub>2</sub>-1-25 e NH<sub>2</sub>-26-44 non causano perdita dell'integrità della membrana mitocondriale interna, in quanto non si ha rilascio della glutatione ridotta, né alterano l'attività di enzimi mitocondriali, in quanto non viene modificata, l'attività dell'adenilato chinasi. Inoltre è stato accertato (i) che nessuno dei due frammenti di tau determina effetti sull'*uptake* dell'ossigeno molecolare

dipendente dai Complessi respiratori I e II (ii) che non aboliscono il potenziale di membrana mitocondriale (iii) non determinano rilascio del citocromo c dal mitocondrio e (iv) non causano produzione di ROS a livello della catena respiratoria.

Nel mitocondrio il processo di trasferimento di equivalenti riducenti lungo la Catena Respiratoria e quello di sintesi dell'ATP sono accoppiati così che il primo fornisce l'energia necessaria per il secondo: la sintesi di ATP non può aver luogo se non si genera il gradiente protonico elettrochimico transmembrana e, d'altro canto, il consumo di ossigeno è limitato se tale gradiente non viene utilizzato.

In assenza di substrati respiratori aggiunti dall'esterno i mitocondri "respirano" solo grazie all'ossidazione dei substrati endogeni e la velocità di consumo dell'ossigeno è molto bassa.

In presenza di un substrato respiratorio aggiunto dall'esterno (STATO 4) (fig.17), la velocità di consumo dell'ossigeno aumenta, a causa della maggiore disponibilità dei substrati, ma è comunque limitata dalla bassa disponibilità di ADP. Infatti se in queste condizioni si aggiunge ADP (in un mezzo contenente Pi), la velocità di consumo dell'ossigeno aumenta (STATO 3) in quanto il gradiente protonico elettrochimico transmembrana è utilizzato più velocemente, essendo disponibili i substrati per la sintesi di ATP.



**Fig.17** Rappresentazione schematica dello studio della respirazione mitocondriale: misure del consumo di ossigeno causato dall'aggiunta di un substrato ossidabile dai mitocondri (substrato respiratorio). In presenza di substrati endogeni la velocità di consumo dell'ossigeno è bassa, tale velocità aumenta (STATO 4) in presenza di un substrato aggiunto dall'esterno, ma è limitata dalla disponibilità di ADP. Se l'ADP viene aggiunto dall'esterno (STATO 3) la velocità aumenta a livelli maggiori.



La disponibilità di ADP controlla la velocità della respirazione e tale controllo sussiste finché vi è accoppiamento tra l'attività della catena respiratoria e l'attività della ATP sintetasi.

Tale controllo quindi è esercitato a due livelli:

- ◆ regolazione della velocità del consumo di ossigeno e della sintesi di ATP;
- ◆ regolazione dell'efficienza della fosforilazione ossidativa (Kadenbach, 2003);

L'efficienza del processo di accoppiamento si misura sulla base del coefficiente di accoppiamento termodinamico  $q$  che rappresenta l'accoppiamento tra consumo di ossigeno e la produzione di ATP nella fosforilazione ossidativa

$$q = 1 - (J_{sh} / J_{unc})$$

- $J_{sh}$  rappresenta il consumo di ossigeno nello stato stazionario mentre
- $J_{unc}$  rappresenta la respirazione disaccoppiata (*uncoupled rate*) e si ottiene dalla misura della respirazione dello Stato 4 in presenza di succinato 10 mM, rotenone 3  $\mu$ M, dopo l'aggiunta di FCCP 0.12  $\mu$ M, un disaccoppiante sintetico che annulla il gradiente protonico e quindi anche la sintesi di ATP a livello della membrana mitocondriale.

In una prima serie di esperimenti, il disaccoppiante FCCP viene usato per stimolare l'ossidazione del succinato. I mitocondri derivanti dall'omogenato cellulare nello stato 4 consumano ossigeno ad una velocità di 19 natom  $O_2$ / min /mg proteine cellulari. Quando viene aggiunto FCCP la velocità di *uptake* dell' $O_2$  arriva a 116 natom  $O_2$ / min mg proteine cellulari (fig.18) con un indice disaccoppiante di controllo respiratorio RCI (rapporto tra la velocità di consumo di  $O_2$  in presenza del disaccoppiante e quella misurata in sua assenza) pari a 6. Nessun cambiamento nel consumo dell' $O_2$  avviene quando i frammenti amino-terminali di tau vengono aggiunti, sia prima (fig.18-a'-a'') che dopo esposizione al substrato respiratorio (fig.18-b'-b''), confermando ulteriormente che il flusso di elettroni lungo la catena respiratoria non è alterato da tali frammenti.

D'altro canto, quando ADP, viene utilizzato per stimolare l'*uptake* dell' $O_2$  aumentato dal succinato aggiunto esternamente (fig.18-d'), la velocità di consumo dell'ossigeno aumenta fino a 67 natom  $O_2$ / min/ mg proteine cellulari con un RCI pari a 3.5. In presenza del frammento di tau NH<sub>2</sub>-26-44 (1  $\mu$ M), aggiunto sia prima (fig.18-c') che dopo ADP (fig.18-d'), l'aumento di velocità determinato dalla fosforilazione dell'ADP viene essenzialmente abolito. Il frammento di tau NH<sub>2</sub>-1-25 (1  $\mu$ M) non ha alcun effetto (fig.18-c''-d'').

Poiché la generazione del  $\Delta\mu_{H^+}$  non viene alterata da entrambi i frammenti, abbiamo esaminato quali fattori potessero causare un'alterazione nel consumo dell' $O_2$  focalizzando la nostra attenzione sia sullo scambio ATP/ADP, mediato dal traslocatore ANT, che

sull'attività dell'ATP sintetasi.

Nel caso del traslocatore ANT abbiamo utilizzato un protocollo che permette di monitorare il flusso di ATP dai CGC omogenati in presenza di ADP. In un esperimento tipico, gli omogenati vengono trattati con  $AP_5A$ , che inibisce l'adenilato chinasi prevenendo così la sintesi di ATP mitocondriale in maniera non dipendente dalla fosforilazione ossidativa, e successivamente vengono incubati in presenza del sistema di rivelazione dell'ATP (ATP. D.S.), che richiede dunque l'uso di mitocondri integri e fosforilanti. La concentrazione di ATP nella fase extramitocondriale degli omogenati è trascurabile, come mostrato dal fatto che non c'è nessun incremento di assorbanza misurata a 334nm in presenza di glucosio, esochinasi, glucosio-6-fosfato-deidrogenasi e  $NADP^+$ . Nel momento in cui viene aggiunto ADP (0.04mM), viene osservato un incremento nell'assorbanza del NADPH indicando così la comparsa di ATP nella fase extramitocondriale (fig.19).

Come mostrato in fig.19, la formazione di NADPH deriva da:

- a) entrata di ADP nei mitocondri in scambio di ATP endogeno
- b) sintesi di ATP nella reazione catalizzata da ATP sintetasi
- c) uscita dell'ATP neo-sintetizzato in scambio di ADP mediante il traslocatore adenin nucleotide (ANT).

Come atteso, la formazione di NADPH viene completamente inibita in presenza di oligomicina (OLIGO  $10\mu M$ ), un inibitore dell'ATP sintetasi, confermando ulteriormente che negli omogenati l'ATP non può essere sintetizzata mediante la fosforilazione a livello del substrato (fig.19-A). L'aggiunta di atractiloside (ATR  $10\mu M$ ), un inibitore di ANT, inibisce fortemente la formazione di NADPH. La percentuale di formazione di NADPH trovata in questi esperimenti è approssimativamente intorno a 14 nmol  $NADP^+$  ridotti/min/ mg proteine cellulari. In presenza del frammento  $NH_2-26-44$ , questo rapporto diminuisce fortemente a 1,5-2 nmol  $NADP^+$  ridotti/min/ mg proteine cellulari, sia che esso sia aggiunto prima (fig. 19-C) che dopo ADP (fig.19-C) rispettivamente. Al contrario, il frammento  $NH_2-1-25$ (fig.19-D) non sortisce alcun effetto.

Poiché l'attività di ANT misurata nei mitocondri potrebbe dipendere da diversi fattori quali ad esempio il flusso di elettroni attraverso la membrana mitocondriale, la generazione

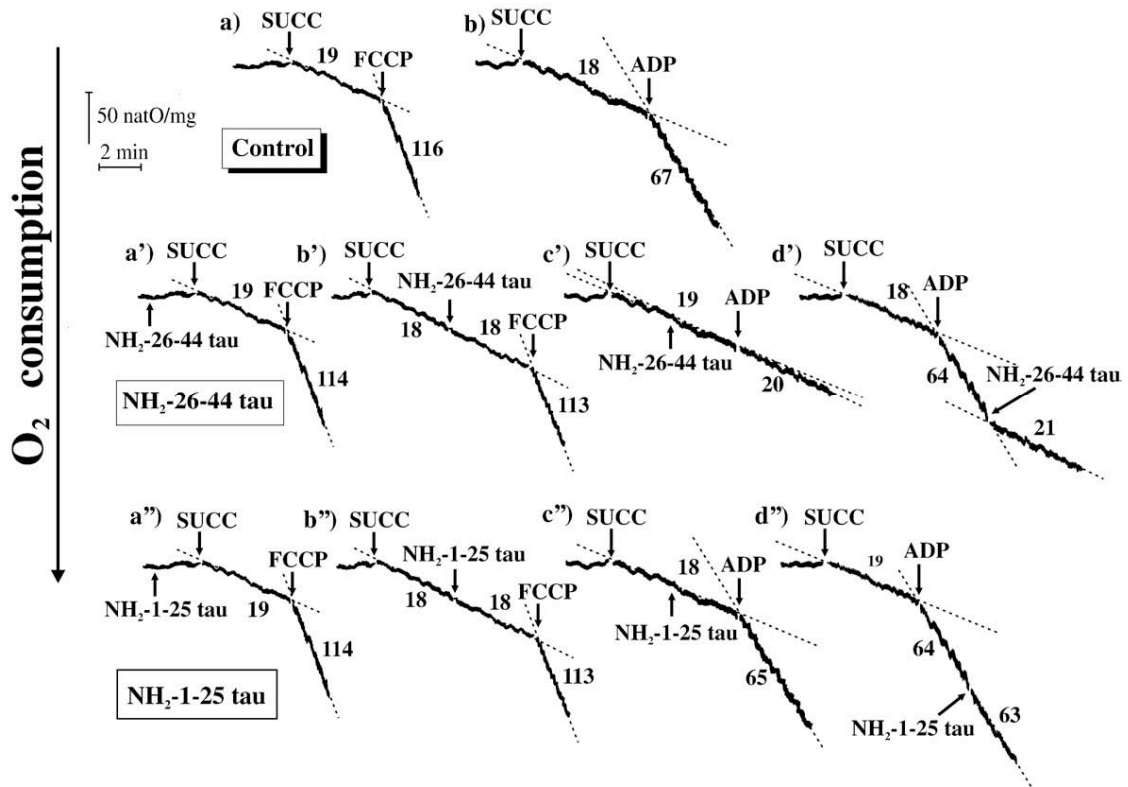
di un gradiente protonico elettrochimico, l'attività dell'ATP sintetasi e il contenuto di adenin nucleotide dei mitocondri, noi abbiamo investigato i passaggi limitanti del processo che portano all'efflusso di ATP dai mitocondri.

Che la velocità di formazione del NADPH fosse indice diretto della velocità di scambio ADP/ATP, è ulteriormente confermato misurando la velocità di comparsa di ATP dovuta all'aggiunta esterna di ADP, in presenza o assenza di concentrazioni crescenti sia di atractiloside che del frammento di tau NH<sub>2</sub>-26-44 (fig.19-E-F). I dati ottenuti sono stati analizzati sia con Dixon plot e sia come  $1/v_i$  contro  $1/[\text{inibitore}]$  dove l'inibizione frazionata  $i = 1 - v_i/v_0$  ( $v_i$  e  $v_0$  sono le velocità di efflusso di ATP in presenza o in assenza di inibitore, rispettivamente). L'intercetta della linea ottenuta graficando i dati sperimentali sia in presenza del frammento NH<sub>2</sub>-26-44 (fig.19-E) che di atractiloside coincide con quella ottenuta in assenza di inibitore. Questi dati dimostrano che ANT è il bersaglio del frammento di tau NH<sub>2</sub>-26-44. Nota inoltre, che l'intercetta sull'asse delle y è pari a 1 dimostrando inequivocabilmente che sia l'atractiloside che il peptide di tau NH<sub>2</sub> 26-44 completamente inibiscono lo scambio mitocondriale ADP/ATP.

Infine noi confermiamo che la diminuzione dell'attività di ANT non dipende dall'incapacità funzionale dei mitocondri di generare il potenziale di membrana utilizzato come forza motrice per l'efflusso di ATP mostrando che anche energizzando i mitocondri con  $\beta$ -idrossibutirrato, un substrato respiratorio che entra nei mitocondri per diffusione aumentando così il potenziale di membrana, non vi è alcuna alterazione dell'attività di trasporto di ANT (fig.19-A). Infine l'osservazione che né il potenziale transmembrana o il gradiente protonico elettrochimico attraverso la membrana mitocondriale, né l'ATP sintetasi limitano il tasso di formazione del NADPH, indicatore indiretto del tasso di scambio ADP/ATP mediato dal traslocatore ANT, è ulteriormente confermato dall'osservazione che il frammento NH<sub>2</sub>-26-44 non altera il flusso elettronico, la produzione del potenziale transmembrana o l'attività dell'attività sintetasi.

Gli esperimenti condotti ci indicano che la maggior azione del frammento di tau NH<sub>2</sub>-26-44 sulla fosforilazione ossidativa mitocondriale è a livello esclusivamente del traslocatore ANT.

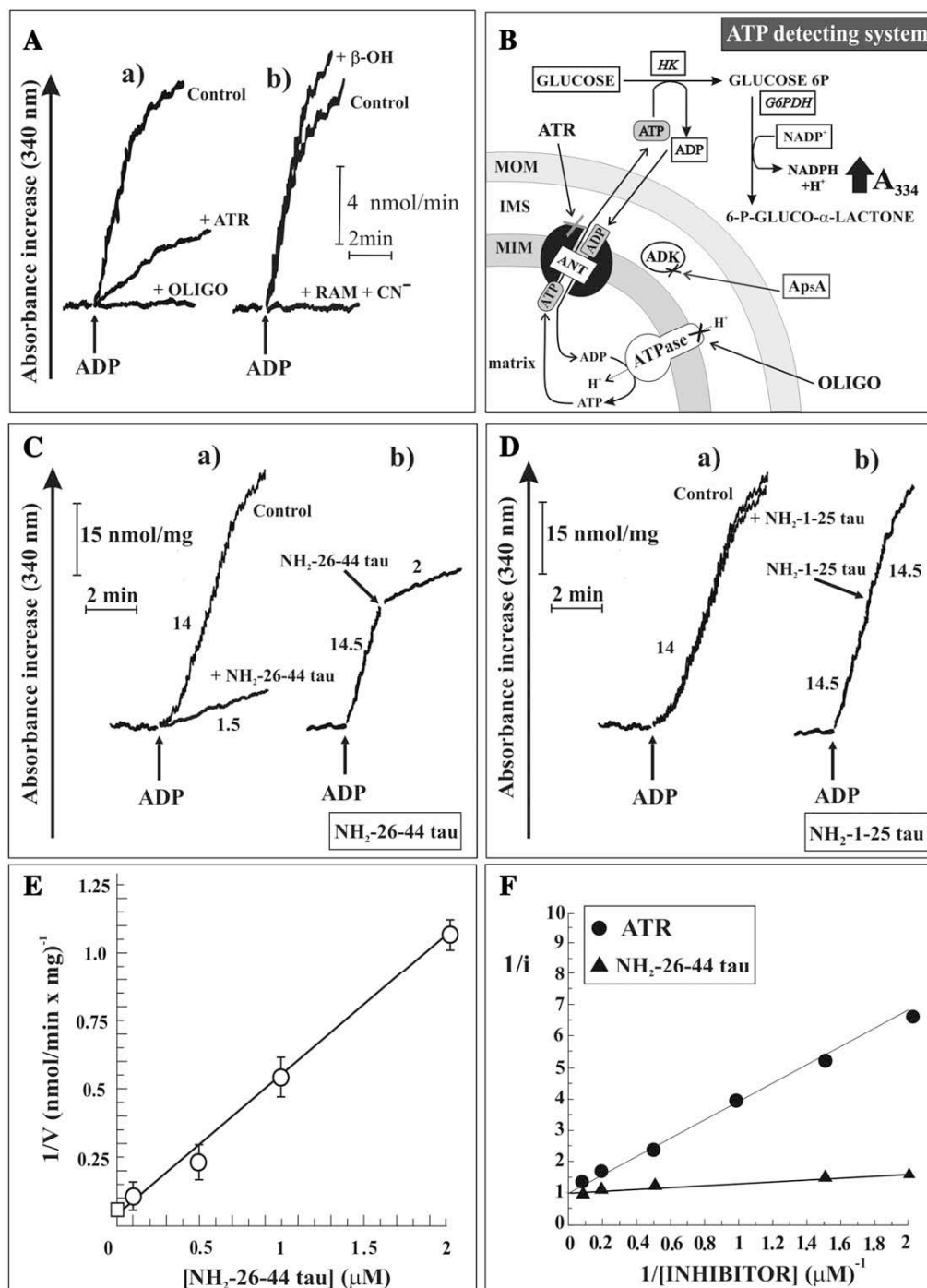
Fig.18



**Fig.18:** Effetto dei frammenti amino-terminali di tau sul consumo di ossigeno mitocondriale (stato3) di omogenati di CGC dovuto al succinato piu' sia FCCP o ADP.

Gli omogenati cellulari (circa 0.2 mg) sono incubati in camere termostate alla temperatura di 25 °C ed il consumo dell' $O_2$  e' determinato in modo polarografico. Il succinato (SUCC 5mM), FCCP (0,12 $\mu$ M), l'ADP (1mM) e i frammenti amino-terminali di tau (1-25 e 26-44 ciascuno 1 $\mu$ M) vengono aggiunti ai tempi indicati. *Control* indica le tracce registrate in assenza dei frammenti N-terminali di tau. L'indice di controllo respiratorio (RCI), riflette l'abilita' dei mitocondri di rispondere all'abolizione del gradiente protonico elettrochimico o di produrre ATP. Le velocita' di uptake dell'ossigeno sono espresse come natom  $O_2$ / min /mg proteine cellulari.

Fig.19



**Fig19:** Effetto dei frammenti N-terminali sullo scambio ADP/ATP mediante ANT nei CGC. La comparsa di ATP dovuta all'aggiunta di ADP agli omogenati di CGC (circa 0.2 mg) e' monitorata come descritta nei Materiali e Metodi. I frammenti N-terminali di tau (1-25 e 26-44) sono aggiunti, 2 minuti prima dell'ADP, ad una concentrazione finale di 1  $\mu$ M. *Control* indica le tracce registrate in assenza dei frammenti N-terminali di tau. (A) Atractiloside (ATR, 10  $\mu$ M), oligomicina (OLIGO, 10 $\mu$ M),  $\beta$ -idrossibutirrato (5mM) ed un cocktail di inibitori della catena respiratoria, *i.e.* 3  $\mu$ M rotenone , 0.8  $\mu$ M antimicina A e mixotiazolo (6 $\mu$ M) (RAM) piu' cianide (CN<sup>-</sup>, 1mM), sono aggiunti alla *mix* di reazione. La concentrazione di ADP e' pari a 0.04 mM. (B) Schema rappresentante il sistema di rivelazione dell'ATP. Per dettagli vedere il testo. (C-D) La comparsa di ATP dovuta all'aggiunta di ADP (0.5mM) ai CGC omogenati in assenza (*Control*) o in presenza sia del frammento NH<sub>2</sub> 1-25 (D) o del frammento NH<sub>2</sub> 26-44 (C) (1 $\mu$ M ciascuno). (E-F). L'intercetta della linea ottenuta graficando i dati sperimentali sia in presenza del frammento NH<sub>2</sub>-26-44 che di atractiloside coincide con quella ottenuta in assenza di inibitore.

## **Discussione**

Si ritiene che la troncazione di tau nell'AD (Novak et al.1991; Novak et al.,1993) sia un evento precoce che avviene prima della formazione degli aggregati neurofibrillari (Guillozet-Bongaarts et al.,2005) e che influenzi l' abilita' fisiologica della proteina stessa di legare e stabilizzare i microtubuli (Fasulo et al., 1996; Canu et al., 1998). Tale evento porterebbe le proteine tau :

- i) ad acquisire una specifica conformazione associata alle *tangles* (Carmel et al., 1996; Ghoshal et al., 2001),
- ii) ad auto- assemblarsi ed aggregarsi in filamenti (Perez et al., 1996; Abraha et al., 2000; Berry et al., 2003; Gamblin et al.,2003; Rissman et al.,2004)
- iii) e ad indurre l' apoptosi (Fasulo et al.,1998; Chung et al.,2001).

In questo studio, viene esaminato ulteriormente il ruolo della troncazione di tau all'estremita' amino-terminale, in diversi modelli animali e cellulari di neurodegenerazione. In particolare, sono stati utilizzati dei paradigmi sperimentali in vitro e in vivo in cui la deprivazione di neurotrofina ricapitola aspetti reminiscenti la neurodegenerazione di tipo AD.

A questo scopo, viene utilizzata una linea cellulare umana SY5Y che, in seguito al trattamento con dbcAMP/NGF per almeno 6 giorni , va incontro ad un marcato processo differenziativo (circa il 95% dell'intera popolazione cellulare) , acquisendo così un fenotipo neuronale maturo. In seguito viene osservato che la staurosporina, un potente inibitore delle protein-chinasi, causa un processo apoptotico, tempo-dipendente che coinvolge l'attivazione delle caspasi e della calpaina I. E' noto in letteratura (Neumar et al., 2003) che Z-VAD-fmk, un inibitore non-competitivo ad ampio spettro delle caspasi, e' sufficiente a bloccare l'attivazione della caspasi-3 e conseguentemente il processo apoptotico. Sulla base di questa serie preliminare di esperimenti, e' stato scelto tale modello cellulare *in vitro* per studiare la correlazione tra apoptosi neuronale, la troncazione

di tau all'estremità ammino-terminale e gli eventi potenzialmente correlati all'AD ed ad altre tauopatie.

Con lo scopo di verificare se durante l'apoptosi neuronale si generasse il frammento N-terminale 26-230 aa di tau, che precedenti studi hanno dimostrato essere altamente neurotossico (Amadoro et al., 2006), le cellule sono trattate con staurosporina ed analizzate per Western blotting o immunocitochimica, utilizzando anticorpi diretti contro differenti epitopi delle estremità ammino- e carbossi- terminali. I nostri risultati dimostrano che la perdita dell'estremità ammino-terminale della proteina tau :

- i) e' un evento precoce durante l'apoptosi neuronale
- ii) e' parallela all'attivazione delle caspasi
- iii) e' prevenuta dagli inibitori delle caspasi.

Il taglio proteolitico di tau e' anche associato con la defosforilazione all'epitopo tau-1 ed e' correlato con la comparsa di caratteristiche morfologiche tipiche dell'apoptosi quali la perdita di neuriti, la frammentazione della cromatina e la comparsa di nuclei condensati Hoechst-positivi. A questo riguardo, e' noto che lo stato fosforilativo di tau e' regolato durante l'apoptosi e puo' differenzialmente alterare la sua suscettibilita' alle proteasi cellulari, sebbene il meccanismo con cui ciò avviene non e' ancora ben chiaro (Johnson, 2006). E' interessante notare che nei neuroni del cervelletto che vanno incontro ad apoptosi, l'aumentata immunoreattività di tau all'epitopo tau-1 e' associata ad un taglio proteolitico mediato dalla calpaina I che genera un frammento di tau di 17 kDa defosforilato (Canu et al., 1998); inoltre in neuroni ippocampali maturi la defosforilazione di tau, indotta dall'incubazione con A $\beta$  pre-aggregata, precede il taglio proteolitico della tau stessa (Park et al., 2005). Infine durante l'apoptosi indotta dalla staurosporina in neuroni corticali, la defosforilazione di tau precede ed e' necessaria per il suo successivo taglio proteolitico (Rametti et al., 2004).

E' importante considerare che il trattamento di colture di neuroni corticali con staurosporina causa non solo una morte per apoptosi, mediata da caspasi e calpaina (Neumar et al., 2003), ma anche la defosforilazione di tau all'epitopo tau-1 prima del taglio proteolitico (Rametti et al., 2004). In maniera analoga, i peptidi A $\beta$  inducono l'attivazione della calpaina-I e della caspasi-3 nei neuroni ippocampali (Park and Ferreira, 2005; Gambelin et al., 2003; Kelly et al., 2005; Park and Ferreira, 2007) e selettivi inibitori di queste proteasi prevengono la proteolisi di tau, sebbene il tempo di attivazione, la proteolisi di tau e l'estensione del processo neurodegenerativo sono sia dose- che tempo-

dipendente. In aggiunta alcuni interessanti esperimenti evidenziano che, in colture neuronali trattate per tempi differenti con il peptide beta amiloide, il taglio proteolitico di tau precede la sua fosforilazione (Rapoport and Ferreira, 2000; Gamblin et al., 2003, Park and Ferreira, 2005 ). In particolare, la troncazione di tau avviene già dopo 6-8 ore di trattamento con il peptide beta amiloide, mentre la fosforilazione è significativamente indotta solo dopo 16-24 ore (Park and Ferreira, 2005 ). In questo lavoro noi riportiamo che la neurodegenerazione mediata da caspasi e calpaina I causa la defosforilazione di tau all'epitopo tau-1 e la troncazione di tau all'estremità amino-terminale generando una serie di frammenti defosforilati di tau, incluso il frammento caspasi-derivato di 20-22 kDa. Sebbene i nostri risultati indichino che le caspasi possano essere le principali proteasi coinvolte nella generazione del frammento di 20-22 kDa, noi non escludiamo la possibilità di un coinvolgimento della calpaina I nella proteolisi di tau. D'altro canto, il relativo ruolo di caspasi e calpaina I nella proteolisi di tau (Canu et al., 1998; Park and Ferreira, 2005; Park and Ferreira, 2007) è supportato da evidenze sperimentali che delineano una intricata e reciproca connessione tra i due sistemi proteolitici in numerosi sistemi cellulari neuronali (Rami, 2003; Wang et al., 1998; Neumar et al., 2003). Tuttavia, esperimenti che prevedono l'utilizzo di un protocollo di eccitotossicità neuronale, che coinvolge il trattamento con alte dosi di glutammato o ionofori del calcio attivanti esclusivamente la calpaina I (Jamsa et al., 2006), non causano la formazione del frammento di tau di 20-22 kDa. Ulteriori esperimenti saranno infine necessari per stabilire l'esatto contributo di entrambe tali proteasi al taglio proteolitico di tau. Inoltre è possibile che non solo la caspasi-3 ma anche altre caspasi, che condividono con la caspasi-3 un analogo sito-consensus di riconoscimento nella proteina bersaglio tau, possono contribuire alla sua proteolisi nel cervello. La caspasi-2, le caspasi-6 e -7 condividono infatti similarità con la caspasi-3 nei loro substrati preferiti (Talanian et al., 1997). La caspasi-2 e la caspasi-6 sono attivate parallelamente con la caspasi-3 in modelli di danno neuronale e nei cervelli AD (Singh et al., 2001; Shimohama et al., 1999; Albrecht et al., 2007). L'uso di inibitori più selettivi, l'analisi mutazionale e/o studi di spettrometria di massa potranno confermare, *in vivo*, l'esatto sito di taglio della(e) caspasi sull'estremità amino-terminale della proteina tau umana.

Inoltre, il frammento amino-terminale di tau di 20-22 kDa è anche rilevato in altri modelli *in vitro* di apoptosi neuronale caspasi-mediata, indotta dopo rimozione di una neurotrofica o da esposizione al peptide neurotossico A $\beta$ 1-42, quali ad esempio le cellule



PC12 differenziate con NGF (Greene, 1978; Pittman et al., 1993), le cellule di neuroblastoma umano SY5Y differenziate con acido retinoico/BDNF (Encinas et al., 1999; Encinas et al., 2000) e neuroni ippocampali trattati con A $\beta$ 1-42 non fibrillata. Infine noi dimostriamo, sia per analisi di Western blotting su estratti proteici cerebrali che per immunostochimica su sezioni di ippocampo di topi adulti AD11 che manifestano un profondo fenotipo neurodegenerativo di tipo a AD a 15 mesi di età (Capsoni et al., 2000; Capsoni et al., 2002a,b), che la proteolisi di tau in prossimità dell'estremità amino-terminale avviene anche *in vivo* in correlazione con l'attivazione delle caspasi. Ulteriori studi saranno comunque necessari per stabilire a che specifico stadio del processo neurodegenerativo età-dipendente la proteolisi di tau abbia inizio. Tale osservazione ci permetterebbe pertanto di correlare l'inizio della proteolisi di tau con alcuni punti cruciali della neurodegenerazione di tipo AD in tale modello animale, aiutandoci così ad acquisire una maggiore comprensione dei processi che effettivamente si verificano nel cervello umano di pazienti affetti da tale malattia. Le nostre osservazioni sul modello animale AD11, sono infine in accordo con quelle riportate su altri modelli transgenici, quale ad esempio il topo triplo-transgenico che porta le mutazioni PS1(M146V), APP(Swe), and tau(P301L) (Rissman et al., 2004) il quale, come il modello AD11, ricapitola alcune salienti caratteristiche della malattia di AD. Tali evidenze sperimentali corroborano pertanto l'ipotesi che il taglio proteolitico di tau mediato dalle caspasi è un evento importante nella patologia neuro fibrillare del morbo di Alzheimer's.

La presenza del frammento amino-terminale di tau caspasi-derivato nei cervelli dei topi anziani di controllo, sebbene a più bassi livelli rispetto a quella rivelata nei topi di pari età e sesso ma dementi, è probabilmente dovuta ad una basale attivazione delle caspasi, attribuibile in parte anche ad una parziale digestione proteica durante la procedura sperimentale di lisi. È da notare inoltre che frammenti amino-terminali e caspasi-derivati della forma *wild-type* e mutata dell'huntingtina, una proteina coinvolta in un altro disordine neurodegenerativo noto come morbo di Huntington, sono presenti in modo simile sia in cervelli di pazienti non dementi che in quelli affetti dal morbo di Huntington, anche se a diversi livelli intracellulari (Kim et al., 2001). È possibile infine che bassi livelli fisiologici di caspasi localmente attive (McLaughlin et al., 2004), possano essere sufficienti a tagliare substrati come la proteina tau, come parte di un normale processo, in specifici ristretti compartimenti intracellulari, ma che non siano sufficienti a causare una morte cellulare apoptotica. È oltremodo possibile che l'attivazione delle caspasi induca effetti

neurodegenerativi non apoptotici. Infatti recenti evidenze suggeriscono che l'attivazione delle caspasi puo' avvenire indipendentemente dalla morte cellulare e che possa essere anche un evento neuroprotettivo (Mattson et al., 1998; McLaughlin et al., 2003; McLaughlin et al., 2004).

Al contrario, livelli piu' elevati e patologici di caspasi attive, potrebbero evocare un effetto detrimentalmente

- i) mediante l'attivazione della cascata apoptotica,
- ii) mediante l'incremento e l'accumulo di uno o piu' frammenti amino-terminali e caspasi derivati di tau, che sono a loro volta intracellularmente tossici (Amadoro et al., 2004, 2006).

Infine, e' possibile che il frammento N-terminale di tau di 20-22 kDa possa oligomerizzare in aggregati insolubili o possa essere ulteriormente degradato dalla calpaina-I in frammenti dannosi piu' piccoli (Amadoro et al., 2006), la cui rilevazione e' resa difficile o a causa della loro ridotta solubilita' o per il loro sequestro da parte degli autofagosomi o dei corpi di inclusione (Berger et al., 2006).

Recenti studi condotti su cervelli postmortem di pazienti AD e su animali transgenici suggeriscono che la disfunzione mitocondriale con conseguente perdita delle sinapsi e dei piu' precoci segni di neurodegenerazione (Mattson et al., 2006). Analizzando ogni stadio che porta alla sintesi di ATP mediante la fosforilazione ossidativa abbiamo osservato che il frammento NH<sub>2</sub> 26-44, ma non NH<sub>2</sub> 1-25, significativamente altera l'attivita' del traslocatore transmembrana mitocondriale ANT (Atlante et al., 2008). In accordo con Reynolds e colleghi (Reynolds et al., 2005), i frammenti N-terminali di tau sono stati utilizzati nei saggi sperimentali di attivita' mitocondriale nel *range* di 0.5 -1  $\mu$ M. Infatti in condizioni fisiologiche la concentrazione di tau nei neuroni e' circa 2  $\mu$ M (Reynolds et al., 2005; Gamblin et al., 2005) e larga parte della proteina (> 95%) e' strettamente legata ai microtubuli. Tuttavia in condizioni patologiche, come nel caso della troncazione di tau, la tau modificata, si stacca dai microtubuli e si accumula in forme libere raggiungendo una concentrazione di circa 0.5-1  $\mu$ M. Il meccanismo mediante cui il frammento di tau NH<sub>2</sub>-26-44 altera ANT non e' ancora noto e sarà oggetto di ulteriori studi. E' importante sottolineare che, sebbene i PHF glicati da pazienti AD generano radicali liberi (Yang et al., 1995) e l'espressione in vitro di una forma troncata della tau umana porta all'accumulo di ROS (Cente et al., 2006), noi escludiamo che la perdita di funzione di ANT possa dipendere da un danno ossidativo indotto dal frammento di tau dato che nel nostro modello non

rileviamo alcuna produzione di ROS a livello della Catena Respiratoria. Tuttavia studi precedenti hanno dimostrato l'aumentata suscettibilità all'insulto ossidativo causata da disfunzioni mitocondriali dopo overespressione di forme *wild-type* o mutanti (Stamer et al., 2002; Ebner et al., 1998; Santagata et al., 2007; Thies et al., 2007; David et al., 2005) o varianti troncate della proteina tau umana (Cente et al., 2006; Zilka et al., 2006).

Ad ogni modo, i nostri risultati (Atlante et al., 2008) indicano che esiste un piccolo frammento NH<sub>2</sub>-di tau che altera marcatamente la funzione mitocondriale stabilendo così una possibile correlazione fisiopatologica tra la perdita dell'estremità amino terminale di tau, la disfunzione mitocondriale e la morte cellulare per eccitotossicità.

Noi infine ipotizziamo che aberranti eventi apoptotici a carico di specifiche popolazioni neuronali generano uno o più frammenti amino-terminali di tau che, in maniera analoga a quanto riportato per la SOD 1 (superossido dismutasi 1) nella sclerosi amiotrofica laterale (Liu et al., 2004; Ferri et al., 2006) e per le mutante Htt (poliQ espanso nell'Huntington) nel morbo di Huntington (Panov et al., 2002, 2003; Seong et al., 2005), esercitano il loro effetto tossico direttamente o indirettamente sui mitocondri. A tal proposito è stato infatti riportato che i microtubuli e le proteine associate ai microtubuli (MAPs) interagiscono intracellularmente con i mitocondri nel cervello di ratto (Rendon et al., 1990) e che la  $\beta$ -amiloide lega *in vivo* la A $\beta$ AD (A $\beta$  legante l'alcol deidrogenasi) nei mitocondri dei pazienti AD e di topi transgenici (Lustbader et al., 2004). È possibile infine che a livello dei mitocondri, entrambe le proteine coinvolte nell'Alzheimer, come la  $\beta$ -amiloide e tau, esibiscano effetti sinergici accelerando così i meccanismi neurodegenerativi.

In conclusione, i dati riportati in tale lavoro (Corsetti et al., 2008; Atlante et al., 2008) e in precedenti lavori (Amadoro et al., 2004, 2006) provano che le caspasi giocano un duplice ed essenziale ruolo nell'apoptosi in quanto

- (i) degradano la proteina tau endogena, riducendo così in il *pool* intracellulare disponibile per il legame ai microtubuli
- (ii) generano la produzione di uno o più frammenti neurotossici N-derivati di tau i quali ulteriormente contribuiscono al danno neuronale interferendo con l'attività dell'ANT mitocondriale così riducendo la biodisponibilità di ATP cellulare

## Referenze Bibliografiche

- ◆ Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T.C., Cryns, V., Berry, R.W., Kuret, J., Binder, L.I. 2000 C-terminal inhibition of tau assembly *in vitro* and in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.* 113,3737-3745.
- ◆ Albrecht, S., Bourdeau, M., Bennett, D., Mufson, E., Bhattacharjee, M., LeBlanc, A. (2007) Activation of caspase-6 in aging and mild cognitive impairment. *A.J.Pathol.* 170,1200-1209.
- ◆ Al-Bassam, J., Ozer, R.S., Safer, D., Halpain, S., Milligan, R.A., 2002. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J. Cell Biol.* 157, 1187–1196.
- ◆ Amadoro, G., Ciotti, M.T., Costanzi, M., Cestari, V., Calissano, P., Canu, N. 2006 NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103,2892-2897.
- ◆ Amadoro, G., Serafino, A.L., Barbato, C., Ciotti, M.T., Sacco, A., Calissano, P., Canu, N. 2004 Role of N-terminal tau domain integrity on the survival of cerebellar granule neurons. *Cell Death and Differentiation* 11,217-230 .
- ◆ Atlante A., S. Passarella, E. Quagliariello, G. Moreno, C. Salet, 1989. Haematoporphyrin derivative (Photofrin II) photosensitization of isolated mitochondria: inhibition of ADP/ATP translocator, *J. Photochem. Photobiol. B* 4) 35–46.
- ◆ Atlante A, Bobba A, de Bari L, Fontana F, Calissano P, Marra E, Passarella S. 2006. Caspase-dependent alteration of the ADP/ATP translocator triggers the mitochondrial permeability transition which is not required for the low-potassium-dependent apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurochem.* May;97(4):1166-81.

- ◆ Arrasate M, Pérez M, Avila J. 2000. Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res.* Jan;25(1):43-50.
  
- ◆ Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* Sep;8(9):663-72.
  
- ◆ Baker M, Kwok JB, Kucera S, Crook R, Farrer M, Houlden H, Isaacs A, Lincoln S, Onstead L, Hardy J, Wittenberg L, Dodd P, Webb S, Hayward N, Tannenberg T, Andreadis A, Hallupp M, Schofield P, Dark F, Hutton M. 1997. Localization of frontotemporal dementia with parkinsonism in an Australian kindred to chromosome 17q21-22. *Ann Neurol.* Nov;42(5):794-8.
  
- ◆ Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J., Rubinsztein D.C. 2006 Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum. Mol. Genet.* 53, 433-442.
  
- ◆ Berry, R.W., Abraha, A., Lagalwa, S., Lapointe, N., Gamblin, T.C., Cryns, V.L., Binder, L.I. 2003 Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry* 42,8325-8331.
  
- ◆ Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW. 2005. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* Jan 3;1739(2-3):216-23. Review
  
- ◆ Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet.* Jul 29;368(9533):387-403. Review
  
- ◆ Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. 1968. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry.* Jul;114(512):797-811.

- ◆ Boix, J., Llecha, N., Yuste, V.J. and Comella, J.X. 1997 Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines. *Neuropharmacology* 36,811-821.
  
- ◆ Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
  
- ◆ Caceres, A., Kosik, K.S., 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461–463.
  
- ◆ Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M.T., Brancolini, C., Rinaldi, A.M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A., Calissano, P. 1998 Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurosci.* 18,7061-7074 .
  
- ◆ Capsoni, S., Ugolini, G., Comparini, A., Ruberti, F., Berardi, N., Cattaneo, A. 2000 Alzheimer-like neurodegeneration in aged anerve growth factor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97,6826-6831.
  
- ◆ Capsoni, S., Giannotta, S., Cattaneo, A. 2002a Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 12432-12437.
  
- ◆ Capsoni, S., Giannotta, S., Cattaneo, A. 2002b Beta-amyloid plaques in a model for sporadic Alzheimer's disease based on transgenic anti-nerve growth factor antibodies. *Mol Cell Neurosci.* 21,15-28.
  
- ◆ Carmel, G., Mager, E.M., Binder, L.I., Kuret J. 1996 The structural basis of monoclonal antibody Alz-50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 271,32789-32795.
  
- ◆ Cattaneo A. 1998. Selection of intracellular antibodies.. *Bratisl Lek Listy.*

Aug-Sep;99(8-9):413-8

- ◆ Cente ,M., Filipcik, P., Pevalova, M., Novak, M. 2006 Expression of a truncated tau protein induces oxidative stress in a rodent model of tauopathy. *Eur. J. Neurosci.* 24,1085-1090.
- ◆ Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. 1992 . Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* Dec 17;360(6405):674-7.
- ◆ Chun W, Johnson GV. 2007. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Front Biosci.* Jan 1;12:733-56. Review.
- ◆ Chung, C.W., Song, Y.H., Kim, I.K., Yoon, W.J., Ryu, B.R., Jo, D.G., Woo, H.N., Kwon, Y.K., Kim, H.H., Gwag, B.J., Mook-Jung, I.H., Jung, Y.K. 2001 Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol. Dis.* 8,163-172.
- ◆ Corsetti V, Amadoro G, Gentile A, Capsoni S, Ciotti MT, Cencioni MT, Atlante A, Canu N, Rohn TT, Cattaneo A, Calissano P. 2008. Identification of a caspase-derived N-terminal tau fragment in cellular and animal Alzheimer's disease models. *Mol Cell Neurosci.* 2008 Jul;38(3):381-92
- ◆ David D.C., S. Hauptmann, I. Scherping, K. Schuessel, U. Keil, P. Rizzu, R. Ravid, S. Drose, U. Brandt, W.E. Muller, A. Eckert, J. Gotz, 2005. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P3201L tau transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 280, 23802–23814.
- ◆ De Rosa R, Garcia AA, Braschi C, Capsoni S, Maffei L, Berardi N, Cattaneo A. 2005. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 8;102(10):3811-6.

- ◆ De Strooper B, Annaert W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* Jun;113 ( Pt 11):1857-70. Review.
  
- ◆ Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD. 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med.* Oct;14(10):1097-105
  
- ◆ Ebner A., R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek, E. Mandelkow, 1998 Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implication for Alzheimer's disease, *J. Cell Biol.* 143, 777–794.
  
- ◆ Encinas, M., Iglesias, M., Llecha, N., Comella, J.X. 1999 Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-Kinase are involved in Brain-Derived Neurotrophic factor- mediated survival and neuriteogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Neurochem.* 73,1409-1421.
  
- ◆ Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Mushaisen, A., Cena, V., Gallego, C., Comella, J.X. 2000 Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, to fully differentiated neurotrophic factor-dependent human neuron-like cells. *J. Neurochem.* 75,991-1003.
  
- ◆ Fasulo, L., Ovecka, M., Kabat, J., Bradbury, A., Novak, M., Cattaneo, A. 1996 Overexpression of Alzheimer's PHF core tau fragments: implications for the tau truncation hypothesis. *Alzheimer's Res.* 2,195-200.
  
- ◆ Fasulo, L., Visintin, M., Novak, M., Cattaneo, A. 1998 Tau truncation in Alzheimer's disease. Expression of a fragment encompassing PHF tau core induces apoptosis in COS cells. *Alzheimer's Rep.* 1,25-32.



- ◆ Ferreira, A., and Caceres, A., 1992 Expression of the class III- $\beta$  tubulin isotype in developing neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* 32,516–529.
  
- ◆ Ferri A., M. Cozzolino, C. Crosio, M. Nencini, A. Casciati, E.B.V. Gralla, G. Rotilio, J. Selverstone Valentine, M.T. Carri, 2006. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13860–13865.
  
- ◆ Gamblin, T.C., Berry, R.W., Binder, L.I. 2003 Modeling tau polymerization in vitro. A review and synthesis. *Biochemistry* 42,15009-15017.
  
- ◆ Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R.W., Binder, L.I., Cryns, V.L. 2003 Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100,10032-10037.
  
- ◆ Gamblin TC. 2005. Potential structure/function relationships of predicted secondary structural elements of tau. *Biochim Biophys Acta.* Jan 3;1739(2-3):140-9. Review.
  
- ◆ Gandy S. 2005. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* May;115(5):1121-9. Review.
  
- ◆ García-Sierra F, Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G. 2008. Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* Aug;14(4):401 9.
  
- ◆ Ghoshal, N., Garcia-Sierra, F., Fu, Y., Beckett, L.A., Mufson, E.J., Kuret, J., Berry, R.W., Binder, L.I. 2001 Tau-66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 77,1372-1385 .

◆ Goedert M, Crowther RA, Garner CC. 1991. Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. Trends Neurosci. May;14(5):193-9. Review

◆ Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lübke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VM. 1993. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 1;90(11):5066-70.

◆ Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., Feinstein, S.C., 1997. Functional interactions between the prolinerich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. Mol. Biol. Cell 8, 353–365.

◆ Greene, L. 1978 Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. J. Cell Biol. 78,747-755.

◆ Greenberg SG, Davies P. 1990 A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug;87(15):5827-31

◆ Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments.. J Biol Chem. May 5;261(13):6084-9

◆ Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986

Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul;83(13):4913-7.

◆ Guillozet-Bongaarts, A.L., Garcia-Sierra, F., Reynolds, M.R., Horowitz, P.M., Fu, Y., Wang, T., Cahill, M.E., Bigio, E.H., Berry, R.W, Binder, L.I. 2005

Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 26,1015-1022.

◆ Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. 1992. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*. Jun 11;357(6378):500-3.

◆ Haass C, Selkoe DJ. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*. Dec 17;75(6):1039-42.

◆ Hardy, J. and Selkoe, D.J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road of therapeutics. *Science* 297, 353-356

◆ Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. 1988. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol.* Oct;107(4):1449-59.

◆ Hoffmann R, Lee VM, Leight S, Varga I, Otvos L Jr. 1997 Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry*. Jul 1;36(26):8114-24

◆ Horowitz, P.M., Patterson, K.R., Guillozet-Bongaarts, A.L., Reynolds, M.R., Carroll, C.A., Weintraub, S.T., Bennett, D.A., Cryns, V.L., Berry, R.W., Binder, L.I. 2004 Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24,7895-902.

◆ Hutton M, Pérez-Tur J, Hardy J. 1998. Genetics of Alzheimer's disease. *Essays Biochem.*;33:117-31. Review.

◆ Ignelzi MA Jr, Miller DR, Soriano P, Maness PF. 1994. Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron*. Apr;12(4):873-84.

◆ Irizarry MC, Rebeck GW, Cheung B, Bales K, Paul SM, Holzman D,

Hyman BT. 2000. Modulation of A beta deposition in APP transgenic mice by an apolipoprotein E null background. *Ann N Y Acad Sci.*;920:171-8. Review.

◆ Jamsa, A., Backstrom, A., Gustafsson, E., Dehvari, N., Hiller, G., Cowbure, R.F., Vasange, M. 2006 Glutamate treatment and p25 transfection increase Cdk5 mediated tau phosphorylation in SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys Res. Commun* 345,324-331.

◆ Johnson, G.V. 2006 Tau phosphorylation and proteolysis: insights and perspectives. *J. Alzheimers Dis.* 9,243-250.

◆ Kadenbach B. 2003 Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* Jun 5;1604(2):77-94. Review

◆ Kampers T., Friedhoff P., Biernat J., Mandelkow E.M, Mandelkow E., 1996. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments, *FEBS Lett.* 399 344–349.

◆ Kanai Y, Chen J, Hirokawa N. 1992. Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J.* Nov;11(11):3953-61

◆ Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M., Amos, L.A., 2003. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* 22, 70–77.

◆ Kelly BL, Vassar R, Ferreira A. 2005. Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* Sep 9;280(36):31746-53.

◆ Kim YJ, Yi Y, Sapp E, Wang Y, Cuiffo B, Kegel KB, Qin ZH, Aronin N, DiFiglia M. 2001. Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate

with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 23;98(22):12784-9

◆ Knowles, R., LeClerc, N., Kosik, K.S., 1994. Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 28, 256–264.

◆ Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun;83(11):4044-8

◆ Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol.* Jan 14;47(1):69-85.

◆ Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V.M., Litersky, J.M., Bhaskar, K., Fang, S.M., Do, L.H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., Ksiezak-Reding, H., 2004. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 2304–23012.

◆ Lee G. 2005. Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta.* Jan 3;1739(2-3):323-30. Review

◆ Liu R., B. Yuan, S. Emadi, A. Zameer, P. Schulz, C. McAllister, Y. Lyubchenko, G. Goud, M.R. Sierks, 2004 Single chain variable fragments against beta-amyloid (A $\beta$ ) can inhibit A $\beta$  aggregation and prevent a $\beta$ -induced neurotoxicity, *Biochemistry* 43, 6959–6967.

◆ Lu, D. C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R. F., Ellerby, L. M., Ye, X., Salvesen, G. S., Koo, E. H. and Bredesen, D. E. 2000. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med* 6, 397-404.

- ◆ Lustbader J.W., M. Cirilli, C. Lin, H.W. Xu, K. Takuma, N. Wang, C. Caspersen, X. Chen, S. Pollak, M. Chaney, F. Trinchese, S. Liu, F. Gunn-Moore, L.F. Lue, D.G. Walker, P. Kuppusamy, Z.L. Zewier, O. Arancio, D. Stern, S.S. Yan, H. Wu, 2004. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease, *Science* 304, 448–452.
  
- ◆ Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res. Sep-Oct;32(5):367-81. Review*
  
- ◆ Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E. 1995. Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging. May-Jun;16(3):355-62; discussion 362-3. Review*
  
- ◆ Manthorpe, M., Fagnani, R., Skaper, S.D., Varon, S. 1986 An automated colorimetric microassay for neuronotrophic factors *Brain Res.* 390,191-198.
  
- ◆ Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243-54.
  
- ◆ Mattson MP, Cheng A. 2006. Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci.* Nov;29(11):632-9. Review
  
- ◆ Mattson, M.P., Keller, J.N., Begley, J.G. 1998 Evidence for synaptic apoptosis. *Exp. Neurol.* 153,35-48.
  
- ◆ Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. 1985 Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.* Nov;4(11):2757-63

- ◆ McLaughlin B., Hartnett, K.A., Erhardt, J.A., Legos, J.J., White, R.F., Barone, F.C., Aizenman, E. 2003 Caspase-3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 715-720
  
- ◆ McLaughlin B., 2004 The kinder side of killer proteases: caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodelling. Apoptosis 9,111-121.
  
- ◆ Neumar, R.W., Xu, Y.A., Gada, H., Guttman, R.P., Siman, R. 2003 Cross-talk between calpain and caspase proteolytic system during neuronal apoptosis J.Biol.Chem. 278,14162-14167.
  
- ◆ Novak, M., Jakes, R., Edwards, P.C., Milstein, C., Wischik, C.M. 1991 Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibody 423 and 7.51. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88,5827-5841.
  
- ◆ Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M. 1993 Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. EMBO J. 12,365-370.
  
- ◆ Panov A.V., C.A. Gutekunst, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, J.R. Burke, W.J. Strittmatter, J. T. Greenamyre, 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are direct effect of polyglutamines, N. Neurosci. 5, 731–736.
  
- ◆ Panov A.V., J.R. Burke, W.J. Strittmatter, J.T. Greenamyre, 2003. In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca<sup>2+</sup>-dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease, Arch. Biochem. Biophys. 410, 1–6.
  
- ◆ Park, S.Y. and Ferreira, A. 2005 The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates  $\beta$ -amyloid-induced neurodegeneration. J. Neurosci. 25,5365-5375.

- ◆ Park SY, Tournell C, Sinjoanu RC, Ferreira A. 2007. Caspase-3- and calpain-mediated tau cleavage are differentially prevented by estrogen and testosterone in beta-amyloid-treated hippocampal neurons. *Neuroscience*. Jan 5;144(1):119-27.
  
- ◆ Passer B, Pellegrini L, Russo C, Siegel RM, Lenardo MJ, Schettini G, Bachmann M, Tabaton M, D'Adamio L. 2000. Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis*. Nov;2(3-4):289-301.
  
- ◆ Peraus, G.C., Masters, C.L., Beyreuther, K. 1997 Late compartments of amyloid precursor protein transport in SY5Y cells are involved in beta-amyloid secretion. *J. Neurosci*. 17,7714-7724.
  
- ◆ Perez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., Avila, J. 1996 Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J. Neurochem*. 67,1183-1190.
  
- ◆ Perez, M., Cuadros, R., Smith, M.A., Perry, G., Avila, J., 2000. Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett*. 486, 270–274.
  
- ◆ Pesavento, E., Capsoni, S., Domenici, L., Cattaneo, A. 2002 Acute cholinergic rescue of synaptic plasticità in the neurodegenerating cortex of anti-nerve-growth-factor mice. *Eur. J. Neurosci*. 15,1030-1036.
  
- ◆ Petrozzi L, Ricci G., Giglioli N. J., Siciliano G., Mancuso M. 2007. Mitochondria and Neurodegeneration. *Biosci Rep* (2007) 27:87–104.
  
- ◆ Pillot T, Drouet B, Queillé S, Labeur C, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Pinçon-Raymond M, Chambaz J. 1999. The nonfibrillar amyloid beta-peptide



induces apoptotic neuronal cell death: involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J Neurochem.* Oct;73(4):1626-34

◆ Pittman, R.N., Wang, S., DiBenedetto, A.J., Mills, J.C. 1993 A system for characterizing cellular and molecular events in programmed cell death. *J. Neurosci.* 13,3669-3680.

◆ Pongrac JL, Rylett RJ. 1998. Molecular mechanisms regulating NGF-mediated enhancement of cholinergic neuronal phenotype: c-fos trans-activation of the choline acetyltransferase gene. *J Mol Neurosci.* Aug;11(1):79-93.

◆ Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD. 1998. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* Jun;43(6):815-25.

◆ Rametti, A., Esclaire, F., Yardin, C., Terro, F. 2004 Linking alteration in tau phosphorylation and cleavage during neuronal apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279,54518-54528.

◆ Rami A. 2003. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol Dis.* Jul;13(2):75-88.

◆ Rapoport M, Ferreira A. 2000. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J Neurochem.* Jan;74(1):125-33.

◆ Reddy PH, Beal MF. 2005. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 49(3):618–632

◆ Reddy PH, Beal MF. 2008. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* Feb;14(2):45-53.

- ◆ Rendon A., D. Jung, V. Jancsik, 1990. Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria, *Biochem. J.* 269, 555–556.
  
- ◆ Reynolds, M.R., Berry, R.W., Binder, L.I. 2005 Site-specific nitration differentially influences tau assembly in vitro. *Biochemistry* 44,13997-14009.
  
- ◆ Rissman, R.A., Poon, W.W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M.P., LaFerla, F.M., Rohn, T.T., Cotman, C.W. 2004 Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J. Clin. Invest.* 114,121-130.
  
- ◆ Rohn, T.T., Rissman, R.A., Davis, M.C., Kim, Y.E., Cotman, C.W., Head, E. 2002 Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol.Dis.* 11,341-354.
  
- ◆ Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.* Jan;38(1):24-6.
  
- ◆ Ruberti F, Berretta N, Cattaneo A, Cherubini E. 1997. NGF antibodies impair long-term depression at the mossy fibre-CA3 synapse in the developing hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* Jul 18;101(1-2):295-7
  
- ◆ Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, Rossi G, Berardi N, Cattaneo A. 2000. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci.* Apr 1;20(7):2589-601.

- ◆ Saganich, M.J., Schroeder, B.E., Galvan, V., Bredesen, D.E., Koo, E.H., Heinemann, S.F. 2006 Deficit in synaptic transmission and learning in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice require C-terminal cleavage of APP. *J. Neurosci.* 26,13428-13436.
  
- ◆ Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB. 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell.* Aug 25;58(4):615-22.
  
- ◆ Santagata D.D., T. Fulga, A. Duttaroy, M.B. Feany, 2007. Oxidative stress mediates tau- induced neurodegeneration in *Drosophila*, *J. Clin. Inv.* 117, 236–245.
  
- ◆ Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* Apr;81(2):741-66. Review
  
- ◆ Seong I.S., E. Ivanova, J.M. Lee, Y.S. Choo, E. Fossale, M.A. Anderson, J.F. Gusella, J.M. Laramie, R.H. Myers, M. Lesort, M.E. MacDonald, 2005. HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism, *Hum. Mol. Genet.* 14, 2871–2880.
  
- ◆ Shimohama, S., Tanino, H., Fujimoto, S. 1999 Changes in caspase expression in Alzheimer's disease: comparison with development and aging. *B.B.R.C.* 256,381-384.
  
- ◆ Singh, M., Savitz, S.I., Hoque, R., Gupta, G., Roth, S., Rosenbaum, P.S. Rosenbaum, D.M. 2001 Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia. *J. Neurochem.* 77,466-475.
  
- ◆ Sola, E., Capsoni S., Rosato-Siri, M., Cattaneo, A., Cherubini, E. 2006 Failure of nicotine-dependent enhancement of synaptic at Schaffer-collateral CA1 synapses of AD11 anti-nerve growth factor transgenic mice. *Eur. J. neurosci.* 24, 1252-1264.

- ◆ Soto, A.M., Sonnenschein, C. 1985 The role of estrogen on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J. Steroid Biochem.* 23,87-94.
  
- ◆ Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B. 1998. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol.* Apr;8(2):387-402. Review.
  
- ◆ Stamer K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow, E.M. Mandelkow, 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhance oxidative stress, *J. Cell Biol.* 156, 1051–1063. 725
  
- ◆ St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, et al. 1987 The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science.* Feb 20;235(4791):885-90.
  
- ◆ Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., Wong, W.W. 1997 Substrate specificities of caspase family proteases *J. Biol. Chem.* 272,9677-9682.
  
- ◆ Takeda, A., Perry, G., Abraham, N.G., Dwyer, B.E., Kutty, R.K., Laitinen, J.T., Petersen, R.B., Smith, M.A., 2000a. Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with tau. *J. Biol. Chem.* 275, 5395–5399.
  
- ◆ Tanzi RE, St George-Hyslop PH, Haines JL, Polinsky RJ, Nee L, Foncin JF, Neve RL, McClatchey AI, Conneally PM, Gusella JF. 1987. The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amyloid beta-protein gene. *Nature.* Sep 10-16;329(6135):156
  
- ◆ Tatebayashi, Y., Haque, N., Tung, Y.C., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2004. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3b in the regulation of organelle transport. *J. Cell Sci.* 117, 1653–1663.

- ◆ Thies E., E.M. Mandelkow, 2007 Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1, *J. Neurosci.* 27, 2896–2907.
  
- ◆ Vega, I.E., Cui, L., Propst, J.A., Hutton, M.L., Lee, G., Yen, S.H., 2005. Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 138, 135–144.
  
- ◆ Volontè, C., Ciotti, M.T., Battistini, L. 1994 Development of a method for measuring cell number: application to CNS primary neuronal culture. *Cytometry* 17, 274–276.
  
- ◆ Waddel W.J., Hill, C.. 1956. A simple ultraviolet spectrophotometer method for the determination of protein, *J. Lab. Clin. Med.* 48 311–314.
  
- ◆ Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1998. Tau is phosphorylated by GSK-3 at several sites found in AD and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase. *FEBS Lett.* 436, 28–34.
  
- ◆ Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Reinhard, F. B., Schuckert, O., Evin, G. and Masters, C. L. 1999. Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases. *J Biol Chem* 274, 5823–9.
  
- ◆ Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. 1975 A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May;72(5):1858–62
  
- ◆ Yang, L.S. Ksiezak-Reding H., 1995. Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments, *Eur. J. Biochem.* 233, 9–17.
  
- ◆ Zhang J, Johnson GV. 2000. Tau protein is hyperphosphorylated in a site-

specific manner in apoptotic neuronal PC12 cells. *J Neurochem.* Dec;75(6):2346-57

◆ Zhao, M., Su, J., Head, E., Cotman, C. 2003 Accumulation of caspase cleaved amyloid precursor protein represents an early neurodegenerative event in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 14,391-403.

◆ Zilka, N., Filipcik, P., Koson, P., Fialova, L., Skrabana, R., Zilkova, M., Rolkova, G., Kontsekova, E., Novak, M. 2006 Truncated tau form sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* 580,3582-3588.

◆ Züchner T, Perez-Polo JR. 2004. Schliebs RBeta-secretase BACE1 is differentially controlled through muscarinic acetylcholine receptor signaling. *J Neurosci Res.* Jul 15;77(2):250-7

