

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biochimiche e Biotecnologiche

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 05/E1 – Biochimica generale e biochimica clinica

Settore Scientifico disciplinare: BIO/10 Biochimica

**Ruolo delle alterazioni mitocondriali indotte dall'ipossia
nella patogenesi della malattia di Alzheimer**

Presentata da: Dott.ssa Anna Padula

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Santi Mario Spampinato

Prof. Giancarlo Solaini

Esame finale anno 2014

Indice

Introduzione

1.	La malattia di Alzheimer (AD)	6
1.1.	Manifestazioni cliniche della AD	7
1.2.	Caratteristiche istologiche della AD	8
1.3.	Biologia della proteina APP	9
	1.3.1. <i>Metabolismo della proteina APP</i>	
	1.3.2. <i>Ruolo della proteina APP</i>	
	1.3.3. <i>α-secretasi e β-secretasi</i>	
	1.3.4. <i>Le preseniline e la γ-secretasi</i>	
1.4.	Genetica della AD	12
2.	Patogenesi della AD	16
2.1.	Ipotesi della proteina β -amiloide	16
2.2.	Ipotesi mitocondriale	18
	2.2.1. <i>Il peptide β-amiloide raggiunge i mitocondri e altera le proprietà delle membrane</i>	
	2.2.2. <i>Il metabolismo mitocondriale è alterato nell'AD</i>	
	2.2.3. <i>Il peptide β-amiloide è coinvolto nella generazione di ROS a livello mitocondriale</i>	
	2.2.4. <i>L'omeostasi del Ca^{2+} è alterata nell'AD</i>	
	2.2.5. <i>Il tasso di mutazione del mtDNA è aumentato nell'AD</i>	
	2.2.6. <i>La morfologia, la distribuzione e la dinamica mitocondriale sono alterate nell'AD</i>	
2.3.	Ipotesi dello stress ossidativo	26
	2.3.1. <i>Lo stress ossidativo</i>	
	2.3.2. <i>Sistemi antiossidanti endogeni</i>	
	2.3.3. <i>I mitocondri sono la principale fonte di ROS nell'AD</i>	
	2.3.4. <i>Il metabolismo di Cu^{2+} e Fe^{2+} è alterato nell'AD</i>	
	2.3.5. <i>L'attivazione di microglia e astrociti contribuisce allo stress ossidativo nell'AD</i>	
2.4.	Ipotesi vascolare	31
3.	L'ipossia	33
3.1.	HIF-1 e i meccanismi di adattamento metabolico all'ipossia	33
3.2.	Ruolo patologico dell'ipossia nella AD	36

4.	Molecole ad azione protettiva e antiossidante	38
4.1.	Strategie terapeutiche nella AD	38
4.2.	Molecole ad azione protettiva inserite nello studio	40
4.2.1.	<i>Idebenone</i>	
4.2.2.	<i>Acido oleico</i>	
4.2.3.	<i>Spermina</i>	
4.2.4.	<i>Trolox</i>	
	Scopo della tesi	44
	Materiali e metodi	
1.	Colture cellulari e trattamenti	47
1.1.	Cellule PC12 (rat pheochromocytoma)	47
1.2.	Fibroblasti da pazienti affetti da malattia di Alzheimer	48
2.	Determinazione della concentrazione proteica	49
3.	Attività enzimatiche	49
4.	Determinazione del contenuto intracellulare di glutatione	50
5.	Metodi luminometrici	51
6.	Determinazione del consumo di glucosio e della produzione di lattato	52
7.	Misura del contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno	52
8.	Misura del potenziale della membrana mitocondriale interna	53
9.	Microscopia in fluorescenza	54
10.	Analisi dei dati	54
	Risultati	
	<i>PARTE I</i> - Linea cellulare PC12	55
1.	Caratterizzazione del modello cellulare in ipossia	55
2.	Effetti di molecole ad azione protettiva su cellule PC12 esposte all'ipossia ...	61
3.	Azione congiunta dell'ipossia e del peptide β -amiloide ₁₋₄₂	66
	<i>PARTE II</i> - Fibroblasti di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer	73
1.	Disegno sperimentale	73
2.	Attività dell'enzima citrato sintasi e network mitocondriale	74
3.	Contenuto intracellulare di ATP	76
4.	Consumo di glucosio e produzione di lattato	77

5. Potenziale della membrana mitocondriale interna	78
6. Contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno	81
Discussione	
<i>PARTE I</i> - Linea cellulare PC12	82
<i>PARTE II</i> - Fibroblasti di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer	91
Conclusioni	96
Bibliografia	98

Capitolo 1

Introduzione

1. La malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata dalla progressiva perdita della memoria e dalla compromissione generalizzata delle funzioni cognitive [1]. La AD, originariamente descritta dal neuropatologo Alois Alzheimer nel 1907, rappresenta oggi la forma di demenza più comune, essendo diagnosticata in sede autoptica nel 60-70% dei casi di decadimento cognitivo ad esordio tardivo [2].

La AD colpisce attualmente più di 25 milioni di persone, con una incidenza della patologia simile in tutta la popolazione mondiale [3]. L'incidenza della AD aumenta con l'età: è stato stimato che essa si attesti su valori dello 0.6%, 1.0%, 2.0%, 3.3% e 8.4% nelle fasce di età 65-69, 70-74, 75-79, 80-84 e ≥85 anni [4]. Anche la prevalenza della patologia aumenta esponenzialmente con l'età, passando dal 3% tra i soggetti di età compresa tra i 65 e i 74 anni al 50% in quelli che hanno un'età superiore a 85 anni [5]. L'invecchiamento rappresenta dunque il maggiore tra i fattori di rischio per lo sviluppo della AD.

I dati epidemiologici della AD sono tuttavia destinati a peggiorare ulteriormente per effetto dei cambiamenti demografici prospettati sulla base del continuo allungamento della vita media. Secondo le stime, il numero di adulti con età superiore ai 65 anni è destinato ad aumentare drammaticamente nei prossimi vent'anni. Per effetto dell'invecchiamento della popolazione, il numero di casi di persone affette da demenza supererà i 48 milioni nel 2020 e, parallelamente all'aumento dell'incidenza, anche i costi della spesa sanitaria generati dalla

gestione della patologia saranno destinati ad aumentare, confermando il grande impatto socio-economico della AD.

1.1. Manifestazioni cliniche della malattia di Alzheimer

La AD è una patologia estremamente complessa, le cui manifestazioni precoci sono caratterizzate da una considerevole variabilità. Il primo sintomo consiste nella graduale perdita della capacità di memorizzare nuove informazioni. Nella fase iniziale della patologia il paziente tende ad assumere un atteggiamento ripetitivo, ansioso e confuso, che si manifesta principalmente con l'incapacità di ricordare impegni o eventi recenti, la difficoltà di orientarsi in ambienti nuovi, prendere decisioni o fronteggiare situazioni impreviste. Con l'avanzare della malattia si manifestano anche alterazioni di funzioni superiori: il pensiero astratto è impoverito, le capacità di ragionamento logico e di giudizio risultano sensibilmente diminuite. Il paziente manifesta difficoltà nella comunicazione verbale (afasia) e perde interesse per le attività quotidiane, per l'ambiente e per gli altri (apatia). Questa fase della malattia è più facilmente evidenziata in pazienti giovani o che svolgono ancora attività lavorativa; può invece essere più difficilmente individuabile in pazienti anziani o che non svolgono compiti impegnativi da un punto di vista intellettuale. Generalmente i pazienti manifestano anche la perdita della capacità di eseguire azioni che prevedono coordinazione motoria (aprassia) o di riconoscere oggetti di uso quotidiano (agnosia). Nella fase intermedia della patologia, le condizioni cliniche peggiorano sensibilmente. I pazienti manifestano un completo disorientamento spazio-temporale e alterazioni della percezione sensoriale, assumendo comportamenti che mettono in pericolo la loro incolumità. Nella fase avanzata della AD la memoria a lungo e breve termine è irrimediabilmente compromessa e il paziente diventa incapace di svolgere qualsiasi attività della vita quotidiana. In questa fase c'è un elevato rischio di complicanze, quali malnutrizione, disidratazione, malattie infettive. La fase terminale può sopraggiungere nei casi più gravi dopo soli tre anni dall'esordio. I pazienti sopravvivono in media 8-10 anni dalla diagnosi e la morte interviene generalmente per l'insorgenza di complicanze [6, 7].

1.2. Caratteristiche istologiche della malattia di Alzheimer

Le principali lesioni istologiche della AD sono rappresentate dalle placche senili (SP), dagli ammassi neurofibrillari (NTF) e dall'angiopatia amiloide cerebrale (CAA) [8], l'individuazione delle quali *post mortem* consente la diagnosi definitiva.

Le placche senili, prevalentemente concentrate a livello della corteccia limbica e associativa [9], sono costituite da depositi extracellulari insolubili di β -amiloide, una proteina derivante da un precursore di maggiori dimensioni (*APP, Amyloid Precursor Protein*). La forma di amiloide generalmente riscontrata a livello delle placche consiste nella specie $A\beta_{1-42}$. Le placche di amiloide hanno una forma approssimativamente sferica e dimensioni molto variabili che possono andare da 10 a 200 μm (figura 1a). In prossimità delle SP i neuroni sono caratterizzati da un evidente danno dendritico e assonale, da distrofia e da profonde alterazioni ultrastrutturali, mentre gli astrociti e la glia esprimono antigeni correlati all'attivazione cellulare [1].

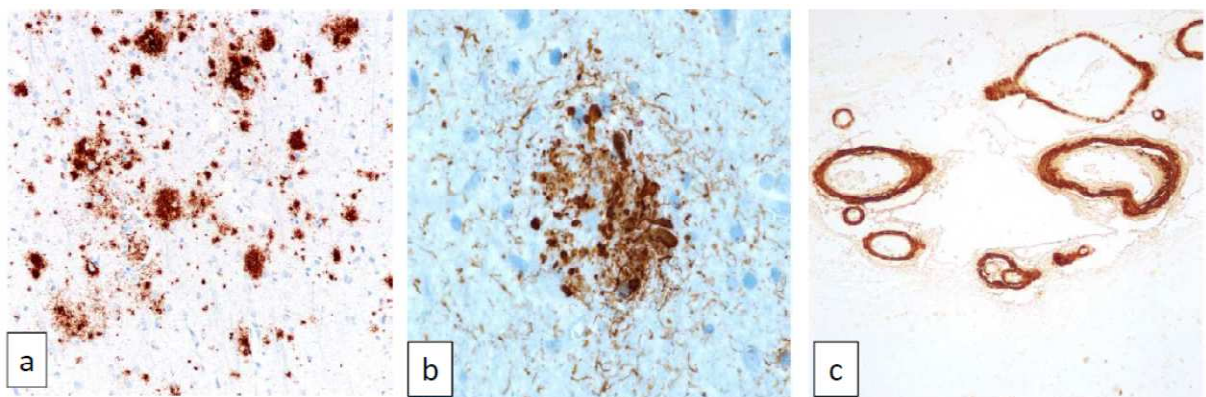


Figura 1. Lesioni istologiche caratteristiche dell'AD riscontrate in sede autoptica. Le immagini sono state ottenute mediante colorazione immunoistochimica utilizzando l'anticorpo monoclonale anti- $A\beta$ 4G8 che riconosce i residui 17-24 di $A\beta$ (a e c) e l'anticorpo anti-tau AT8 che riconosce i residui 202 e 205 fosforilati della proteina tau (b). Placche senili (SP) a livello della corteccia cerebrale (a); ammassi neurofibrillari (NFT) composti da proteina tau (b); depositi di proteina $A\beta$ tipici della angiopatia amiloide cerebrale (CAA) a livello di vasi cerebrali (c). Castellani, Dis Mon 2010;56:484-546 [1].

Molti neuroni nelle regioni tipicamente coinvolte nell'AD (ippocampo, amigdala, corteccia associativa frontale, parietale, temporale e occipitale) contengono grandi ammassi di fibre anomale occupanti lo spazio perinucleare e aventi forma globulare (figura 1b). Questi fibre sono note come ammassi neurofibrillari (NFT) e sono composte da aggregati della proteina

tau. Tau è una proteina associata ai microtubuli che nell'AD va incontro a fosforilazione, diventando insolubile e accumulandosi sottoforma di ammassi neurofibrillari [10, 11, 12].

Il 90% dei soggetti a cui viene diagnosticato l'AD in sede autoptica, presenta depositi di tipo amiloide a livello di arteriole e venule che attraversano la corteccia cerebrale (figura 1c). Tali depositi, costituiti principalmente dal peptide $A\beta_{1-40}$ [1], sono associati a una condizione nota come angiopatia amiloide cerebrale (CAA). La gravità della CAA varia notevolmente tra i soggetti ed è generalmente correlata all'estensione delle SP.

1.3. Biologia della proteina APP

1.3.1. Metabolismo della proteina APP

La proteina β -amiloide deriva dal suo precursore APP (*Amyloid Precursor Protein*) in seguito ad una serie di tagli proteolitici sequenziali. Il termine APP rappresenta un gruppo eterogeneo di polipeptidi espressi ubiquitariamente con un peso di 110-140 kDa [13]. L'eterogeneità di questo gruppo di proteine è dovuta al processo di *splicing* alternativo, che genera tre differenti isoforme di APP contenenti 695, 751 e 770 amminoacidi, e a modifiche post-traduzionali [14, 15]. Le isoforme APP751 e APP770 sono principalmente espresse in cellule non neuronali (cellule periferiche e gliali), mentre APP695 rappresenta l'isoforma neuronale [16]. APP è altamente conservata dal punto di vista evolutivo ed è espressa in tutti i mammiferi nei quali è stata ricercata; un omologo di APP è stato identificato anche in *Drosophila* [17].

APP è una glicoproteina a singolo dominio transmembrana che viene localizzata in sede traduzionale nel reticolo endoplasmatico e successivamente modificata durante una via secretoria costitutiva [18]. Durante il transito dal reticolo endoplasmatico alla membrana plasmatica, la proteina APP viene sottoposta a N- e O-glicosilazioni, solfatazioni e fosforilazioni [19, 20]. APP ha una emivita molto breve (45-60 minuti nella maggior parte dei tipi cellulari analizzati) [21]: dopo aver raggiunto la membrana, viene internalizzata grazie alla presenza di una sequenza segnale localizzata sulla sua estremità C-terminale. Dopo l'endocitosi, APP può seguire due diverse vie. Una frazione di APP internalizzata viene riciclata sulla superficie cellulare, una parte viene invece convogliata verso i lisosomi e gli endosomi tardivi (figura 2). Nel corso di questa via secretoria, APP può essere sottoposta a

una serie di tagli proteolici, i cui prodotti possono essere rilasciati sia nel lume vescicolare che a livello extracellulare. Sono state identificate due vie proteoliche a carico di APP. La prima, nota anche come via *non amiloidogena*, è iniziata dall'enzima α -secretasi; la seconda, detta invece via *amiloidogena*, è avviata dall'enzima β -secretasi.

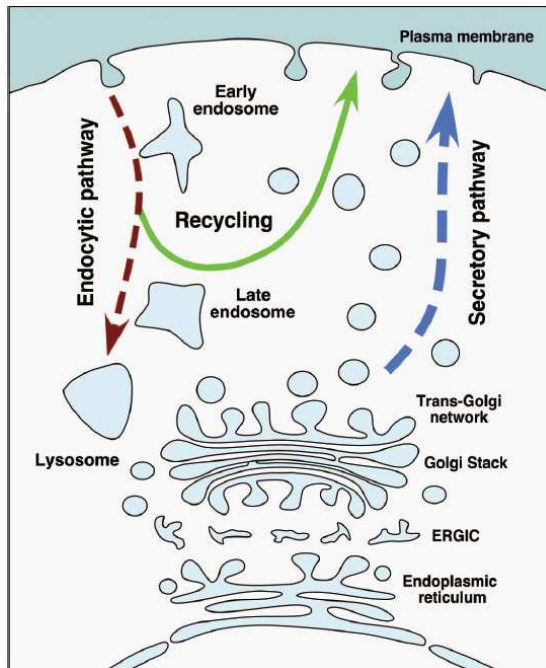


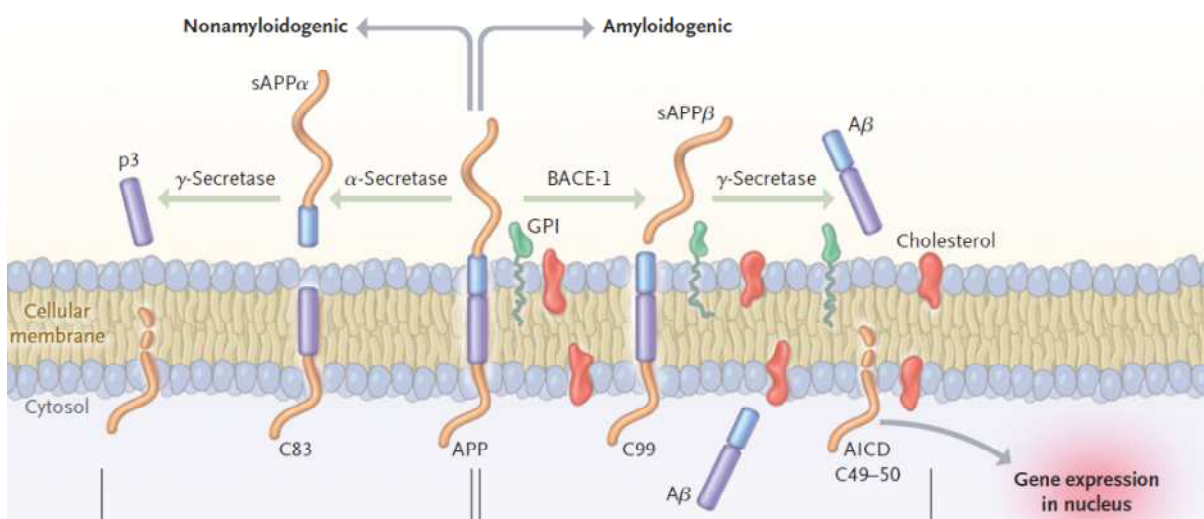
Figura 2. Trafficking intracellulare della proteina APP. Dopo la sintesi, la proteina APP viene modificata attraverso una via secretoria costitutiva (freccia blu). Una volta raggiunta la superficie cellulare, APP è rapidamente internalizzata e successivamente indirizzata al compartimento lisosomiale (freccia rossa) o riciclata sulla membrana plasmatica (freccia verde). La via non amiloidogena si verifica prevalentemente sulla superficie cellulare dove sono presenti le α -secretasi; la via amiloidogena avviene invece negli organelli della via endocitica dove operano la β - e la γ -secretasi. Kulandaivelu, Neurology 2006; 66(Suppl 1):S69-S73.

La α -secretasi taglia APP a livello dell'amminoacido 687, producendo il frammento solubile α (sAPP α), che viene rilasciato nello spazio extracellulare o luminale, e un frammento C-terminale di 83 amminoacidi (C83). Il frammento C83 può essere poi successivamente tagliato da una γ -secretasi, producendo il peptide p3 e il peptide AICD (*APP IntraCellular Domain*). La β -secretasi taglia APP a livello dell'amminoacido 671, generando il frammento solubile β (sAPP β) e il frammento C-terminale C99; il frammento C99 viene poi processato dalla γ -secretasi che produce il peptide AICD e il peptide β -amiloide [22, 23] (figura 3).

1.3.2. Ruolo della proteina APP

Sono stati identificati numerose possibili funzioni della proteina APP e del suo principale derivato solubile sAPP α . In particolare, la proteina solubile sAPP α sembra capace di agire come fattore neuroprotettivo e neurotrofico [24, 25]. Le isoforme APP751 e APP770, che contengono una regione di 56 amminoacidi omologa all'inibitore delle serino-proteasi, sono

in grado di inibire *in vitro* l'attività di alcune serino-proteasi, come la tripsina e la chimotripsina [26], e il fattore IX nella cascata coagulativa [27]. Le isoforme secrete di APP possono conferire proprietà adesive cellula-cellula e cellula-substrato in coltura [28]. È stato inoltre suggerito, sulla base dei risultati di studi *in vitro*, che la APP inserita nella membrana plasmatica possa avere un ruolo nelle interazioni cellulari [29].



*Figura 3. Metabolismo della proteina APP. La via non amiloidegenica inizia con il taglio proteolitico operato dalla α -secretasi che produce il frammento solubile α (sAPP α) e il peptide C83, il quale può essere a sua volta tagliato dalla γ -secretasi, liberando i peptidi p3 e AICD. La via amiloidegenica è iniziata dalla β -secretasi (BACE1) che taglia APP producendo il frammento solubile β (sAPP β) e il peptide C99. La γ -secretasi taglia C99 producendo il peptide β -amiloide e il frammento AICD. AICD è un peptide di circa 50 amminoacidi coinvolto nel controllo della trascrizione genica. Querfurth & LaFerla, *New Engl J Med* 2010;362(4):329-344 [22].*

1.3.3. α -secretasi e β -secretasi

Tre membri della famiglia ADAM (*α disintegrin and metalloprotease*) (ADAM9, ADAM10, ADAM17) sono stati inizialmente identificati per la loro attività α -secretasica [30, 31]. Le proteine della famiglia ADAM sono proteine transmembrana sintetizzate come zimogeni e successivamente clivate e N-glicosilate per dare la proteina attiva. Questi enzimi esplicano la loro attività proteolitica sia a livello dei compartimenti della via secretoria che a livello della membrana plasmatica e agiscono su una grande varietà di substrati, incluse le molecole di adesione e recettori dei fattori di crescita [32]. È stato inoltre dimostrato il loro coinvolgimento nei fenomeni di adesione cellula-cellula e cellula-matrice. Evidenze recenti

suggeriscono che ADAM10 sia la α -secretasi della via non amiloidogena [33]. L'overespressione di ADAM10 in topi transgenici determina un aumento di sAPP α e una diminuita secrezione di A β ; al contrario, la mancanza di questa proteina potenzia la formazione delle placche amiloidi [34].

L'attività β -secretasica è stata riscontrata nella maggior parte delle cellule dell'organismo [35], ma raggiunge la sua massima attività a livello delle cellule neuronali [36]. La principale β -secretasi neuronale è una aspartico-proteasi, denominata BACE1 (*β -site APP cleaving enzyme 1*) [37]. BACE1 è localizzata prevalentemente nel Golgi e negli endosomi [38] e lavora in maniera ottimale in presenza di pH acido; queste evidenze suggeriscono che la via amiloidogena cominci nel compartimento lisosomiale. A sostegno di questa ipotesi ci sono recenti studi, i quali hanno dimostrato che anche la maggior parte delle componenti della γ -secretasi è localizzata a livello del Golgi e degli endosomi tardivi [39] e che solo il 6% è invece localizzata sulla superficie cellulare [40].

1.3.4. Le preseniline e la γ -secretasi

La presenilina in forma di oloproteina (44 kDa) va incontro a una endoproteolisi costitutiva in seguito alla quale si ottiene un eterodimero composto dai frammenti N- e C-terminale [41]. I livelli estremamente bassi di oloproteina nelle cellule e nei tessuti suggeriscono che la forma eterodimerica sia quella dotata di attività. Una volta formati, i frammenti di PSEN possono associarsi ad altre proteine in complessi ad alto peso molecolare (100-200 kDa) che rappresentano la principale forma nella quale la PSEN funziona nelle cellule [42]. È stato dimostrato che la PSEN detiene un ruolo nella segnalazione cellulare mediata dal Notch [43], un recettore coinvolto nei processi di differenziazione cellulare; inoltre la PSEN entra a far parte di complessi multiproteici siti in corrispondenza della superficie cellulare che contengono anche proteine della famiglia delle caderine [44], molecole implicate nella adesione cellulare.

Il coinvolgimento della PSEN nella patogenesi dell'AD deriva dal suo ruolo nel complesso della γ -secretasi e nel metabolismo della APP. Ad oggi è noto che la γ -secretasi è un complesso proteico costituito da quattro proteine differenti: la presenilina (PSEN), la nicastrina, APH-1 (*anterior pharynx-defective 1*) e PEN-2 (*presenilin enhancer 2*) [45] (figura 4). Studi recenti suggeriscono che anche una quinta proteina, nota come CD147, faccia parte

del complesso della γ -secretasi [46]. Attraverso numerosi studi di microscopia elettronica e mutagenesi si è giunti alla descrizione pressoché completa della struttura del complesso proteico della γ -secretasi [47]. Inizialmente, per spiegare il ruolo delle preseniline nell'attività della γ -secretasi sono state proposte due ipotesi: la prima, basandosi sulla capacità di PSEN e APP di coprecipitare, suggeriva che la PSEN prendesse parte direttamente al processo catalitico [48]; la seconda supponeva che PSEN, non interagendo direttamente con APP, avesse solo un ruolo nel *trafficking* di membrana delle proteine che compongono la γ -secretasi [49]. Ad oggi è invece noto che PSEN rappresenta la subunità catalitica del complesso della γ -secretasi [50].

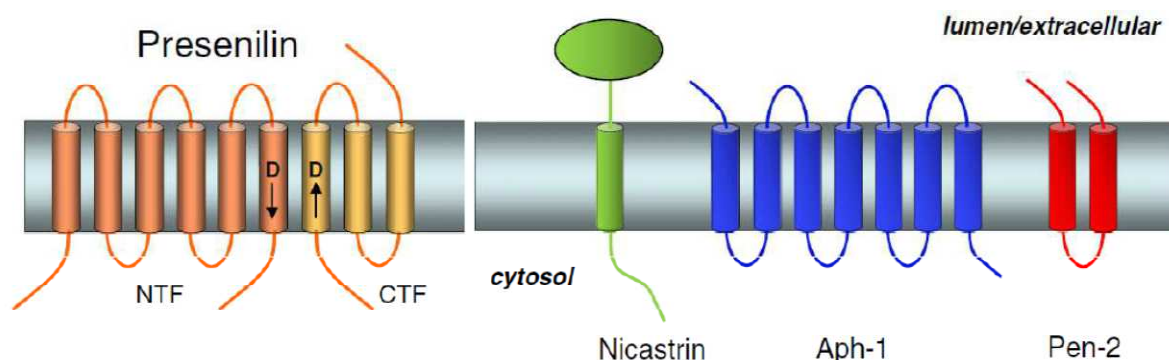


Figura 4. Struttura nota del complesso multiproteico della γ -secretasi. La γ -secretasi è costituita da quattro proteine differenti: la presenilina (PSEN), la nicastrina, APH-1 (anterior pharynx-defective 1) e PEN-2 (presenilin enhancer 2). PSEN è costituita da nove domini transmembrana; dopo essersi assemblata con le altre proteine della γ -secretasi, PSEN va incontro ad un processo di autoproteolisi a livello del loop che connette i domini transmembrana TMD6 e TMD7. TMD6 e TMD7 contengono due residui di aspartato (D) localizzati a livello del sito attivo dell'enzima. Modificato da Wolfe, *Biol Chem* 2010; 391(8):839–847 [47].

1.4. Genetica della malattia di Alzheimer

Negli ultimi decenni è risultato chiaro che la malattia di Alzheimer può essere considerata anche una patologia genetica. Molti casi clinici di AD vengono infatti riscontrati all'interno della stessa famiglia, trasmettendosi in maniera autosomica dominante. È stato stimato che la prevalenza delle forme genetiche vari da un 5-10% fino a una percentuale superiore al 50%. Dal punto di vista fenotipico, i casi di Alzheimer familiare (FAD) e i casi sporadici della patologia (SAD) sono molto simili e spesso indistinguibili, tranne per l'età d'esordio che risulta più precoce per le forme autosomiche dominanti conosciute [23].

La SAD è considerata una patologia multifattoriale. Sono stati identificati numerosi fattori di rischio di carattere non genetico per l'insorgenza dell'AD sporadico (trauma cerebrale, malattie cardiovascolari, alti livelli di colesterolo, fumo, basso tasso di scolarità), ma nessuno di questi si è dimostrato essere il fattore causale della patologia. Un solo fattore genetico è stato riconosciuto come predisponente allo sviluppo della SAD: la presenza dell'allele $\epsilon 4$ della apolipoproteina E (ApoE4). La presenza di ApoE4 sembra essere associata alla riduzione della clearance della $A\beta$ e alla presenza di un aumentato numero di fibrille [51]. L'allele $\epsilon 4$ si presenta con una frequenza maggiore nei soggetti con AD rispetto alla popolazione generale ed è associato a un aumentato rischio di sviluppare la malattia rispetto ai soggetti che presentano gli alleli $\epsilon 3$ e $\epsilon 2$ [52, 53]. La presenza di un singolo allele aumenta il rischio di sviluppare la malattia da 2 a 5 volte, mentre la presenza di $\epsilon 4$ in forma omozigote aumenta questo rischio di oltre 5 volte. Tuttavia la presenza dell'allele $\epsilon 4$ non comporta necessariamente la manifestazione della patologia, ma rappresenta solo un fattore di rischio.

Protein	Gene defects	Phenotype	Age at onset (years)	Inheritance	Contribution to inherited forms
APP	APP mutations	↑ production of all $A\beta$ peptides or $A\beta_{1-40}$	40-60	autosomal dominant	≤ 5%
PSEN1	PSEN1 mutations	↑ production of $A\beta_{1-42}$	30-58	autosomal dominant	≥ 50-75%
PSEN2	PSEN2 mutations	↑ production of $A\beta_{1-42}$	45-88	autosomal dominant	≤ 1%
ApoE	ApoE4 polymorphism	↑ density of $A\beta$ plaques and vascular deposits	40-90	risk factor	risk factor

Tabella 1. Fattori genetici associati all'insorgenza della malattia di Alzheimer. Modificato da Vilatela Arch Med Res 2012;43:622-631.

Le forme di Alzheimer familiare sono generalmente caratterizzate da un esordio precoce della patologia, che si manifesta in questi casi prima dei 65 anni di età. Le mutazioni identificate come responsabili delle FAD sono localizzate nei geni codificanti per l'APP sul cromosoma 21 [54], per la presenilina 1 (PSEN1) sul cromosoma 14 [55] e per la presenilina 2 (PSEN2) sul cromosoma 1 [56].

Sono state identificate ad oggi 34 mutazioni patogene di APP in 90 famiglie [57]. Pur agendo attraverso meccanismi differenti, queste mutazioni hanno come risultato ultimo quello di aumentare la formazione dei depositi di β -amiloide (figura 5). Alcune mutazioni di

APP sono localizzate in prossimità dei siti di taglio della β - e γ -secretasi e sono correlate ad una aumentata produzione di $A\beta$. Altre mutazioni sono invece localizzate nel peptide $A\beta$ e agiscono aumentando le proprietà di aggregazione dello stesso. Un'altra modalità attraverso cui le alterazioni di APP predispongono allo sviluppo di AD, consiste nella sovra-espressione di una proteina APP strutturalmente inalterata [23].

Le mutazioni dei geni PSEN rappresentano la causa più comune di AD autosomico dominante. Attualmente sono state annotate 193 mutazioni di PSEN1 in 90 famiglie e 21 mutazioni di PSEN2 in 22 famiglie [57]. Le mutazioni di PSEN1 causano la forma più aggressiva di AD, caratterizzata dalla manifestazione dei sintomi clinici tra la quarta e la quinta decade di vita. Le mutazioni dei geni codificanti per le preseniline sono correlate ad un aumento della produzione di frammenti $A\beta_{1-42}$, i cui livelli risultano aumentati sia nel plasma che nel mezzo di coltura di fibroblasti di pazienti affetti [58, 59]. I dati finora pubblicati suggeriscono che le mutazioni dei geni delle preseniline agiscono determinando, piuttosto che una perdita di attività, un incremento della loro funzione a cui consegue un potenziamento dell'attività catalitica del complesso della γ -secretasi (figura 5).

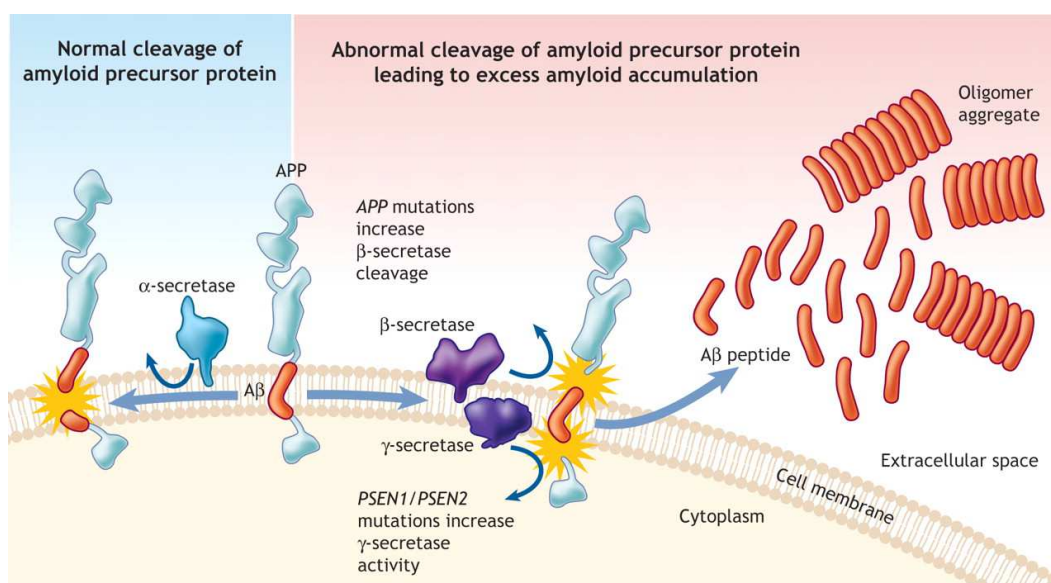


Figura 5. Ruolo delle mutazioni di APP e PSEN nella patogenesi della AD. Le mutazioni della proteina APP favoriscono la proteolisi attraverso la via amiloidogena, mentre le mutazioni delle preseniline aumentano l'attività della γ -secretasi. Entrambe si traducono in un aumento della produzione del peptide $A\beta$.

2. Patogenesi della malattia di Alzheimer

Nonostante siano state formulate differenti ipotesi circa i meccanismi che contribuiscono all'insorgenza e alla progressione della malattia di Alzheimer, l'esatta eziopatogenesi rimane ancora oscura. In questa sezione saranno prese in considerazione alcune tra le ipotesi di patogenesi descritte nel corso degli anni.

2.1. Ipotesi della proteina β -amiloide

L'ipotesi della β -amiloide, proposta da Hardy e Higgins nel 1992 [60], sostiene che nella overproduzione e nell'accumulo del peptide $A\beta$ dovute alla presenza di mutazioni a carico dei geni codificanti per APP e PSEN, risiedano le principali cause di neurotossicità nell'AD [61] (figura 6).

Il peptide $A\beta$ è caratterizzato da una elevata tendenza ad aggregare [62] formando oligomeri e fibrille insolubili che, accumulandosi a livello extracellulare, danno luogo alle ben note placche senili. I depositi extracellulari di $A\beta$ innescano un progressivo danno sinaptico e l'attivazione di una risposta infiammatoria.

Il danno sinaptico rappresenta una delle prime alterazioni funzionali nella AD [63]. Gli oligomeri di $A\beta$ inducono l'endocitosi dei recettori AMPAR per il glutammato [64] e compromettono il rilascio presinaptico dell'acetilcolina nonché l'attività dei recettori per l'acetilcolina stessa [65], inibendo di fatto la segnalazione neuronale associata a questi neurotrasmettitori. $A\beta$ è inoltre in grado di legarsi ai recettori delle neurotrofine, reprimendo i segnali mediati da esse [66]. Queste alterazioni determinano a lungo andare la perdita delle sinapsi, fenomeno direttamente associato alla compromissione delle funzioni cognitive.

La presenza di $A\beta$ determina poi l'attivazione della microglia e degli astrociti, che innescano e sostengono il processo infiammatorio. La microglia produce grandi quantità di interleuchina 1, interleuchina 6, TNF- α e induce la NO sintasi. L'attivazione degli astrociti nei siti di accumulo di $A\beta$ si traduce invece nella secrezione di prostaglandine, leucotrieni, trombassani e inibitori delle proteasi. Le fibrille di $A\beta$ sono anche in grado di attivare direttamente il sistema del complemento. Il processo infiammatorio innescato dai depositi extracellulari di $A\beta$ costituisce un'ulteriore fonte di danno neuronale e, insieme ai

meccanismi di danno sinaptico poc'anzi descritti, sostiene il processo di morte neuronale [67, 68].

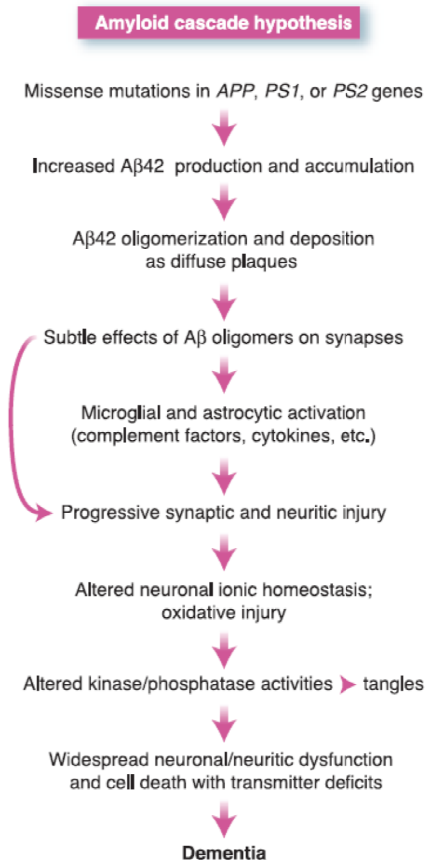


Figura 6. Ipotesi della proteina amiloide. Le mutazioni dei geni codificanti per APP e per PSEN determinano un aumento della produzione del peptide Aβ, che si accumula a livello extracellulare formando le placche senili (SP). La presenza di SP altera la funzionalità sinaptica e induce l'attivazione della microglia e degli astrociti, sostenendo uno stato infiammatorio. Si assiste così a un progressivo danno sinaptico. Lo stato di stress ossidativo innescato dall'infiammazione determina uno squilibrio nelle attività di chinasi e fosfatasi, da cui deriverebbe il fenomeno di iperfosforilazione della proteina tau e la formazione degli ammassi neurofibrillari. La morte cellulare derivante da questi meccanismi di danno è responsabile della neurodegenerazione di aree diffuse dell'ippocampo e della corteccia cerebrale, da cui derivano i sintomi clinici della AD. Hardy & Selkoe, Science 2002; 297:353-356.

Secondo l'ipotesi della proteina amiloide la condizione di stress ossidativo derivante dallo stato infiammatorio, sarebbe anche responsabile dell'alterazione delle attività fosforilative, evento che scatenerrebbe, in seguito alla iperfosforilazione della proteina tau, la formazione degli ammassi neurofibrillari (NFT). Tau è una proteina che si lega e stabilizza i microtubuli ed è particolarmente abbondante nei neuroni; essa può esistere in diversi stati di fosforilazione, i quali regolano le sue proprietà di legame ai microtubuli. Nell'AD l'eccessiva attivazione delle chinasi o la riduzione dell'attività delle fosfatasi determina la iperfosforilazione di tau, in seguito alla quale tau si dissocia dai microtubuli e forma aggregati intracellulari insolubili noti come NFT. La dissociazione di tau dai microtubuli determina anche l'instabilità dei microtubuli stessi, compromettendo il trasporto assonale [22] (figura 7).

L'ipotesi della proteina amiloide sostiene quindi che le maggiori alterazioni strutturali e funzionali riscontrabili nelle prime fasi della AD siano tutte dirette conseguenze dell'accumulo extracellulare del peptide Aβ. Numerosi studi hanno tuttavia evidenziato

come la disfunzione neuronale nell'AD possa essere causata anche dall'azione intracellulare del peptide A β e non solo dal danno indotto dai depositi extracellulari. I meccanismi di "danno intracellulare" sostenuti dalla A β si esplicano principalmente attraverso l'alterazione della funzionalità mitocondriale e l'induzione di uno stato di stress ossidativo, per entrambi i quali è stato dimostrato il contributo essenziale nel processo di patogenesi.

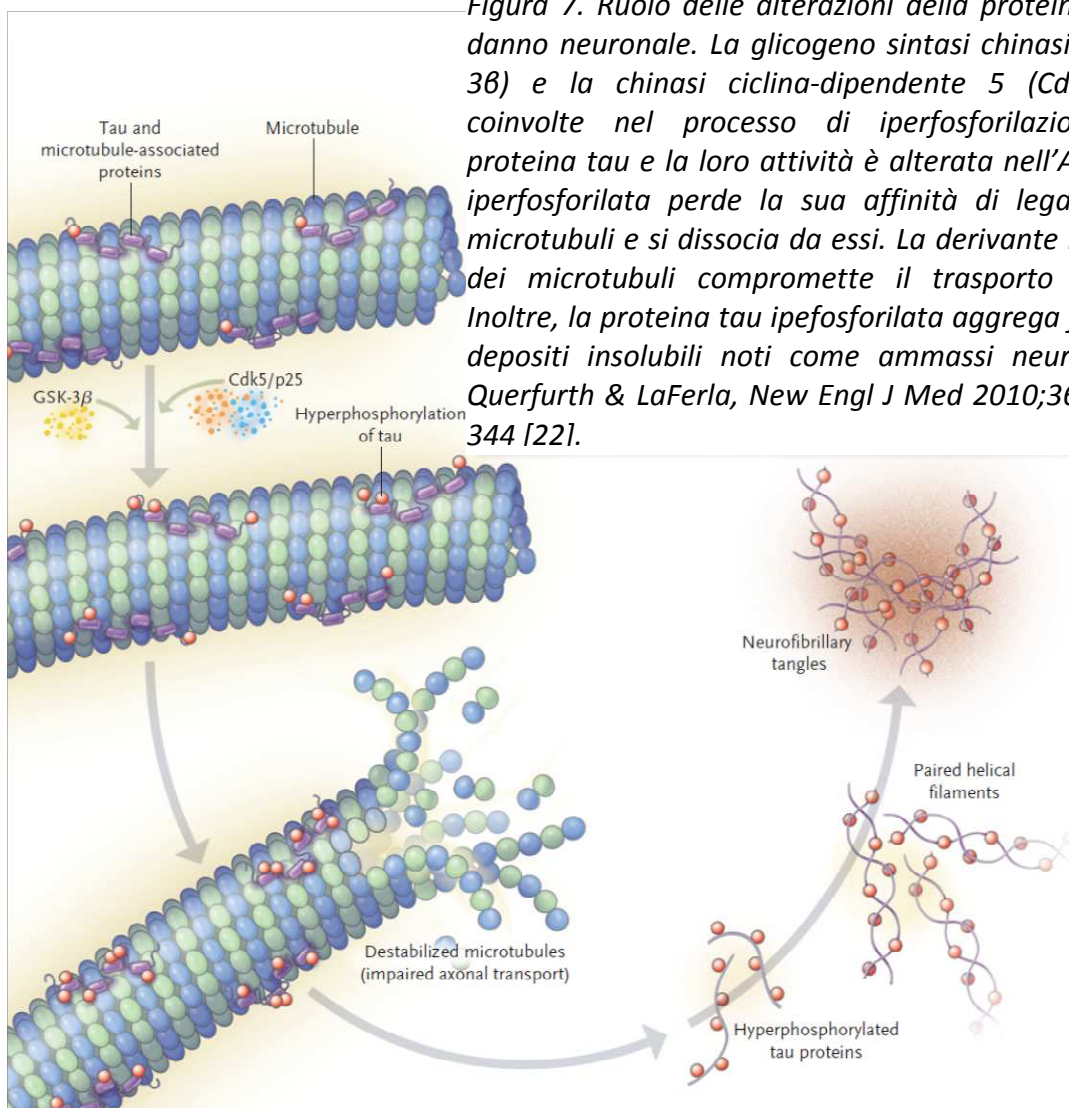


Figura 7. Ruolo delle alterazioni della proteina tau nel danno neuronale. La glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK-3 β) e la chinasi ciclina-dipendente 5 (Cdk5) sono coinvolte nel processo di iperfosforilazione della proteina tau e la loro attività è alterata nell'AD. La tau iperfosforilata perde la sua affinità di legame per i microtubuli e si dissocia da essi. La derivante instabilità dei microtubuli compromette il trasporto assonale. Inoltre, la proteina tau iperfosforilata aggrega formando depositi insolubili noti come ammassi neurofibrillari. Querfurth & LaFerla, New Engl J Med 2010;362(4):329-344 [22].

2.2. L'ipotesi mitocondriale

L'ipotesi della proteina amiloide è stata formulata dopo aver scoperto che le mutazioni di APP, PSEN1 e PSEN2, determinanti l'aumento della produzione di A β , erano associate alla comparsa di Alzheimer familiare. I soggetti affetti da Alzheimer sporadico non possiedono mutazioni di APP o delle preseniline e per essi la causa dell'aumentata produzione di A β

rimane tuttora sconosciuta [69]. Nel 2004 Swerdlow e Khan proposero la cosiddetta “ipotesi mitocondriale”, nel tentativo di spiegare come e perché si sviluppa l’Alzheimer di tipo sporadico [70]. Secondo questa ipotesi la compromissione della funzionalità mitocondriale legata all’invecchiamento rappresenta la prima alterazione patologica nella AD, a cui seguono l’attivazione dei processi di amiloidogenesi e degenerazione sinaptica (figura 8).

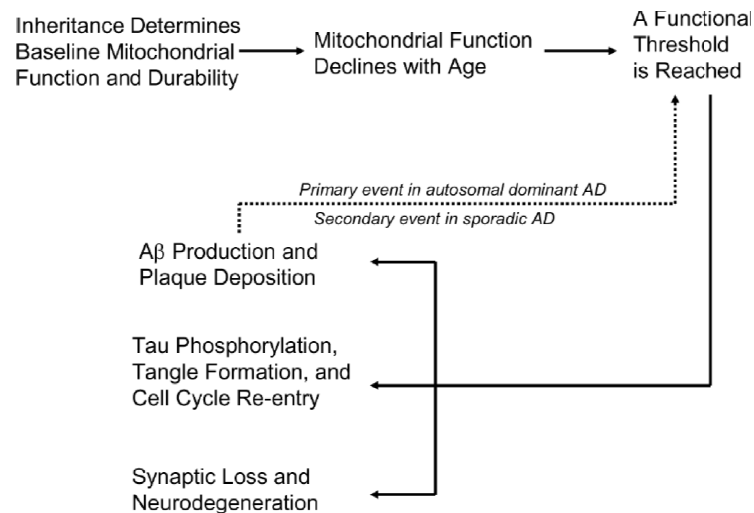


Figura 8. L’ipotesi mitocondriale. L’alterazione della funzionalità mitocondriale è il fenomeno iniziatore responsabile della neurodegenerazione nei casi di AD sporadico. La funzionalità mitocondriale si riduce progressivamente con l’invecchiamento, raggiungendo una soglia al di sotto della quale vengono innescati i fenomeni di amiloidogenesi, iperfosforilazione della proteina tau, alterazione del ciclo cellulare e degenerazione sinaptica. Swerlow & Khan, Exp Neurol 2009; 218:308-315.

I neuroni sono caratterizzati da una elevata domanda energetica dovuta principalmente alla necessità di sostenere i gradienti ionici di membrana, critici per la generazione dei potenziali d’azione [71]. La loro limitata capacità glicolitica li rende altamente dipendenti dalla OXPHOS mitocondriale come fonte di energia [72]. I mitocondri sono inoltre regolatori dei processi di morte cellulare, evento comune a tutte le patologie neurodegenerative. È dunque facilmente intuibile la ragione per la quale l’alterazione della funzionalità mitocondriale rappresenti una caratteristica delle malattie neurodegenerative, compresa la AD.

Al contrario dell’ipotesi della β -amiloide, per la quale la disfunzione mitocondriale è un evento a valle dei meccanismi iniziatori della AD, l’ipotesi mitocondriale sostiene che tale disfunzione sia invece l’agente eziologico della patologia. Nonostante tutte le prove portate a sostegno delle due ipotesi, non è tuttora chiaro se l’alterazione mitocondriale sia una conseguenza della AD o se essa si verifichi nelle primissime fasi della patogenesi.

Al di là di queste considerazioni sul “momento” in cui i mitocondri intervengono nella patologia, è ormai chiaro che nell'AD si verifica una compromissione a più livelli della funzionalità mitocondriale. Tali alterazioni sono ascrivibili, in gran parte, all'azione tossica diretta del peptide A β a livello dei mitocondri stessi [73].

2.2.1. Il peptide β -amiloide raggiunge i mitocondri e altera le proprietà delle membrane

Numerose evidenze hanno dimostrato che sia la proteina APP sia il peptide A β sono presenti a livello dei mitocondri nei neuroni di pazienti AD.

La proteina APP possiede una sequenza segnale di localizzazione mitocondriale, attraverso la quale viene riconosciuta dal trasportatore della membrana esterna mitocondriale TOM40. APP va però incontro ad un trasferimento incompleto all'interno dei mitocondri, in seguito al quale le estremità N- e C-terminale di APP vengono localizzate rispettivamente nella matrice e nel citosol. L'interazione di APP e TOM40 si traduce quindi nel blocco del trasportatore e, di conseguenza, nel blocco del trasferimento delle proteine mitocondriali codificate dal genoma nucleare. L'inibizione del processo di trasferimento proteico indotto da APP è stato dimostrato essere associato alla disfunzione mitocondriale nella AD [74, 75]. I livelli di APP mitocondriale correlano con la severità della patologia; sono particolarmente alti nelle regioni cerebrali più vulnerabili nella AD (come la corteccia frontale, l'amigdala e l'ippocampo), interessando prevalentemente i neuroni colinergici [75]. Sebbene sia stata dimostrata la presenza di APP a livello dei mitocondri, rimane il dubbio che la sua topologia possa permettere il taglio da parte degli enzimi della via amiloidogenica [76]. Pertanto l'origine della A β mitocondriale rimane sconosciuta. Tuttavia, sia forme monomeriche che oligomeriche del peptide A β sono state riscontrate a livello della membrana mitocondriale interna [77, 78]. Successivamente è stato poi dimostrato che il peptide A β può essere attivamente traslocato all'interno dei mitocondri attraverso i trasportatori TOM40 e TIM22 [79]. Una volta accumulatasi a livello della membrana mitocondriale, il peptide A β è in grado di alterarne la proprietà fisiche. Quando mitocondri isolati vengono incubati in presenza di A β , si assiste a una significativa riduzione della fluidità della membrana interna. Le proprietà destabilizzanti della A β potrebbero avere un effetto negativo sull'attività delle proteine della OXPHOS, contribuendo in questo modo ai meccanismi di tossicità mitocondriale [80].

È stato inoltre dimostrato che il peptide A β è in grado di alterare la permeabilità della membrana mitocondriale, interagendo direttamente con le proteine del poro di transizione (MPTP) [81], e di indurre il rilascio di citocromo c [80].

2.2.2. Il metabolismo energetico è alterato nell'AD

La deregolazione del metabolismo energetico è considerata una delle principali cause del decadimento cognitivo che caratterizza la AD e si ritiene che essa si verifichi nelle fasi iniziali della patologia, prima della manifestazione dei sintomi clinici.

Nei pazienti AD è stata documentata un'alterazione del *signaling* dell'insulina: i livelli di insulina e di IGF-1 risultano infatti alterati, mentre i recettori dell'insulina e i trasportatori del glucosio (GLUT1 e GLUT13) sono sensibilmente ridotti. Questi fenomeni comportano una riduzione dell'*uptake* del glucosio, che contribuisce al deficit energetico tipico dei neuroni AD. Anche il metabolismo glicolitico risulta alterato. È stato infatti dimostrato che l'attività di alcuni enzimi glicolitici, quali per esempio la fosfofruttochinasi e la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, è fortemente inibita con la conseguente riduzione dei livelli di piruvato. In aggiunta, il trasporto del piruvato nei mitocondri e la sua conversione ad acetil-CoA sono compromessi dalla riduzione dell'attività del complesso della piruvato deidrogenasi (PDHC). L'alterazione della PDHC, insieme all'inibizione degli enzimi isocitrato deidrogenasi e α -chetoglutarato deidrogenasi, si traduce in una riduzione del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e nella conseguente riduzione della disponibilità di cofattori ridotti (NADH e FADH₂) veicolati verso la catena di trasporto degli elettroni. Studi sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che il grado di disabilità nei pazienti AD è correlato con l'entità della compromissione degli enzimi del TCA [82].

Una delle maggiori alterazione del metabolismo energetico riscontrate nell'AD consiste nella alterazione della fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Il peptide A β è in grado di inibire il complesso IV (citocromo c ossidasi, COX). Un possibile meccanismo di questa inibizione risiede nella capacità della A β di instaurare un legame diretto con il gruppo eme-a, formando un complesso A β -eme che mostra anche un'attività perossidasiica [83]. La riduzione dell'attività COX è stata dimostrata non solo a livello dei neuroni di pazienti AD [84, 85], ma anche a livello delle piastrine [84, 86] e dei fibroblasti [87], dimostrando che la disfunzione mitocondriale nell'AD si manifesta in realtà a livello sistemico e non solo nelle aree cerebrali

interessate dalla neurodegenerazione. La riduzione dell'attività COX è stata inoltre dimostrata in tutte le fasi della patologia, inclusa la fase iniziale di decadimento cognitivo lieve [88].

In esperimenti su mitocondri isolati incubati in presenza di A β , il peptide si è dimostrato anche capace di inibire la fosforilazione ossidativa e di ridurre il consumo di ossigeno [80]. La deregolazione della OXPHOS si traduce nella riduzione della disponibilità di ATP e nell'aumento dei ROS generati a livello della catena respiratoria, fenomeni che contribuiscono fortemente a sostenere il processo neurodegenerativo.

2.2.3. Il peptide β -amiloide è coinvolto nella generazione di ROS a livello mitocondriale

La riduzione della OXPHOS comporta una riduzione dell'efficienza del trasferimento degli elettroni, che a sua volta determina un aumento della produzione di ROS prevalentemente a livello del complesso I e del complesso III. Questi ROS generati a livello della catena esplicano la loro azione dannosa principalmente a carico delle macromolecole mitocondriali [89]. Il peptide A β non solo promuove la generazione di ROS a livello dei mitocondri, ma ne inibisce contestualmente la rimozione.

È stato infatti dimostrato che la A β è in grado di inibire la superossidodismutasi mitocondriale (MnSOD), enzima maggiormente coinvolto nella detossificazione dell'anione superossido e nella protezione dal danno perossidativo [90]. La A β inoltre è in grado di legarsi e inibire la alcol deidrogenasi mitocondriale nota come ABAD (*A β binding alcohol dehydrogenase*). ABAD possiede un ruolo protettivo, essendo responsabile della detossificazione dalle aldeidi come il 4-idrossinonenale. L'interazione tra il peptide A β e la ABAD compromette il processo di detossificazione di cui è responsabile l'enzima, provocando perossidazione lipidica, generazione di ROS e disfunzione mitocondriale [91].

2.2.4. L'omeostasi del Ca²⁺ è alterata nell'AD

Il Ca²⁺ è coinvolto nella regolazione di numerosi processi cellulari, quali il metabolismo mitocondriale, la trasmissione sinaptica, la sopravvivenza cellulare. L'alterazione dell'omeostasi del Ca²⁺ intracellulare è una caratteristica comune delle patologie neurodegenerative, inclusa la AD [92].

Il peptide A β sembra essere capace di indurre il rilascio del Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico, determinando l'aumento dei livelli di Ca²⁺ intracellulare [93]. Quando la concentrazione del calcio aumenta all'interno del citosol, parte di questo ione viene immagazzinato all'interno della matrice mitocondriale attraverso un trasporto attivo. Il sovraccarico di Ca²⁺ nei mitocondri determina l'alterazione dell'equilibrio ionico, la produzione di ROS, l'abbassamento del potenziale di membrana e, infine, la riduzione della sintesi di ATP. L'aumento del Ca²⁺ intramitocondriale può anche indurre l'apertura del MPTP, a cui segue il rilascio di fattori proapoptici.

È stato inoltre dimostrato che elevate concentrazioni citosoliche di Ca²⁺ stimolano l'aggregazione di A β [94] e l'attivazione della via amiloideogena [95]. Anche le PSEN sono coinvolte nell'omeostasi del Ca²⁺, e le mutazioni normalmente associate a FAD possono alterare il controllo del Ca²⁺ a livello del reticolo endoplasmatico [96].

Le sinapsi rappresentano il sito primario di disregolazione della concentrazione del Ca²⁺. Numerose evidenze hanno dimostrato che il peptide A β interagisce direttamente con il recettore per il glutammato NMDAR attivandolo. L'attivazione di NMDAR determina l'ingresso di Ca²⁺ nel citosol, che a sua volta induce il rilascio del Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico. L'attivazione dei recettori NMDAR indotta dall'A β si traduce in uno stato eccitatorio cronico (eccitotossicità), che aggrava il danno neuronale soprattutto nelle fasi avanzate della patologia [97].

2.2.5. Il tasso di mutazione del mtDNA è aumentato nell'AD

Il mtDNA è particolarmente suscettibile al danno ossidativo. A causa della ridotta efficienza dei sistemi di riparazione e della prossimità con la catena di trasporto degli elettroni, il tasso di mutazione del mtDNA è molto più alto di quello del DNA nucleare. Inoltre, è stato dimostrato che il livello di danno ossidativo del DNA aumenta esponenzialmente con l'età, determinando un accumulo nel tempo di mutazioni somatiche [98].

Il mtDNA dei neuroni di pazienti AD presenta un tasso di ossidazione significativamente più alto di individui sani di pari età, soprattutto nelle aree dei lobi frontali, parietali e temporali [99]. L'ossidazione delle basi azotate aumenta il rischio che si verifichino errori durante il processo di duplicazione, con il conseguente accumulo di mutazioni somatiche. Di fatto, nei soggetti affetti da AD sono state identificate numerose mutazioni del mtDNA, le quali sono

state correlate al progressivo declino della funzionalità mitocondriale caratterizzante la patologia [100]. In particolare, a livello dei geni mitocondriali codificanti per le subunità del complesso IV sono state identificate sia delezioni di ampie regioni di mtDNA (inclusa una delezione di 4977bp) [101], sia mutazioni puntiformi associate a forme sporadiche di AD a esordio tardivo [102].

2.2.6. La morfologia, la distribuzione e la dinamica mitocondriale sono alterate nell'AD

In condizioni fisiologiche la morfologia, la dimensione, il numero e la distribuzione dei mitocondri dipendono dall'equilibrio di due processi opposti: la fusione e la fissione mitocondriale [103]. Questi due eventi sono coinvolti nella regolazione di numerosi processi, quali la produzione dell'energia, la segnalazione mediata dal Ca^{2+} , la produzione di ROS, l'apoptosi. La fusione mitocondriale, necessaria per esempio per la redistribuzione dei metaboliti, è regolata da tre grandi GTPasi: la mitofusina 1 (Mfn 1), la mitofusina 2 (Mfn 2) e la proteina dell'atrofia ottica (OPA 1). La fissione, che interviene durante la divisione cellulare per garantire una omogenea segregazione dei mitocondri nelle cellule figlie o per assicurare la distribuzione dei mitocondri lungo il citoscheletro, è regolata da una GTPasi (DLP1, *dynamin like protein 1*) e dalla proteina Fis1.

I livelli di espressione di DLP1, OPA1, Mfn1 e Mfn2 sono significativamente ridotti nell'AD, determinando un'alterazione nei processi di fusione e fissione mitocondriale [104]. I neuroni di pazienti AD sono infatti caratterizzati da un numero molto alto di mitocondri danneggiati, frammentati e dalla dimensione anomala. Recentemente è stato dimostrato che l'over-espressione di APP, precursore della A β , determina la riduzione dei livelli di DLP1 con conseguente frammentazione e anomala distribuzione dei mitocondri, aumento dei ROS e ridotta produzione di ATP [105]. Inoltre, la S-nitrosilazione di DLP1, riscontrata *in vivo* nel cervello di pazienti AD e indotta *in vitro* in presenza di A β , contribuirebbe ad aumentare la fissione mitocondriale [106]. Anche la distribuzione dei mitocondri è alterata, dal momento che questi si accumulano a livello del soma neuronale piuttosto che lungo le terminazioni sinaptiche [107]. La deplezione dei mitocondri dalle sinapsi, dovuta ad una alterata dinamica mitocondriale, sembrerebbe contribuire alla disfunzione sinaptica che rappresenta il primo evento patologico della AD.

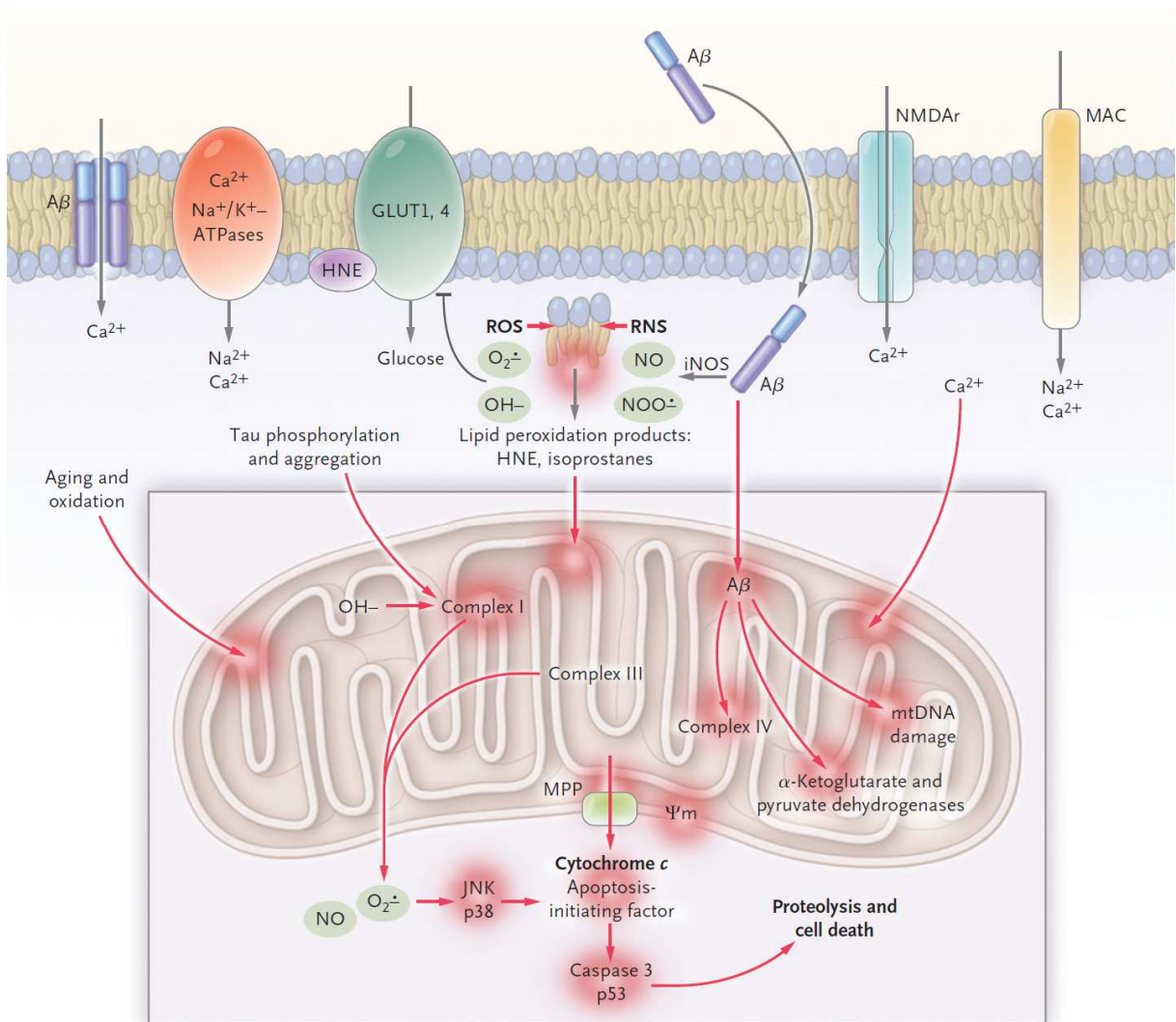


Figura 9. Disfunzione mitocondriale e stress ossidativo nella AD. Il peptide Aβ è un potente induttore di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), le quali inducono perossidazione lipidica e conseguente formazione di tossine, come l'idrossinonenale (HNE) e la malonildialdeide. L'attività dei trasportatori del glucosio (GLUT1 e 4) è inibita. La concentrazione citosolica di Ca²⁺ è aumentata per effetto dell'alterata funzione delle proteine di membrana coinvolte nella sua omeostasi (ATPasi, recettori per il glutammato – AMPAR, complesso di attacco alla membrana – MAC) e dalla formazione di canali ionici costituiti dal peptide Aβ intercalato all'interno della membrana. Interferendo con l'attività di numerosi enzimi, il peptide Aβ altera il metabolismo mitocondriale e induce la produzione di una grande quantità di ROS da parte dei complessi I e III. Il tasso di mutazione del mtDNA è aumentato per effetto del danno ossidativo. Il potenziale della membrana mitocondriale (Ψ_m) collassa, determinando l'apertura del poro di transizione MPP) a cui segue il rilascio del citocromo c e l'attivazione delle caspasi. Il processo apoptotico è ulteriormente sostenuto dall'attivazione delle chinasi p38 e JNK (c-jun N-terminal kinase) mediata dalle ROS. Querfurth & LaFerla, *New Engl J Med* 2010;362(4):329-344 [22].

2.3. Ipotesi dello stress ossidativo

2.3.1. Lo stress ossidativo

Il termine stress ossidativo rappresenta la condizione che si stabilisce quando a livello cellulare si instaura uno sbilanciamento tra i processi di produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quelli responsabili della loro rimozione [108]. I processi di produzione e rimozione delle ROS sono strettamente regolati, così da garantire che all'interno delle cellule venga preservato un ambiente riducente. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) rappresentano un gruppo di molecole caratterizzate da una elevata tendenza a reagire con substrati di varia natura ossidandoli.

In condizioni fisiologiche le ROS sono normalmente prodotte all'interno della cellula. È stato dimostrato che le ROS sono mediatori in numerose vie di segnalazione che prendono parte al controllo del ciclo cellulare. Livelli intracellulari di ROS bassi o moderati sono associati all'attivazione di segnali coinvolti nei processi di sopravvivenza, crescita, proliferazione e migrazione cellulare. Elevate quantità di ROS possono invece danneggiare le strutture cellulari e, conseguentemente, attivare le vie di segnalazione di morte cellulare [109] (figura 10).

Proteine, acidi nucleici e lipidi rappresentano i principali bersagli dell'azione ossidante delle ROS. Le proteine possono subire reazioni di ossidazione soprattutto a livello delle catene laterali di lisina, arginina, prolina e treonina. La carbonilazione è la conseguenza dell'ossidazione delle proteine e generalmente risulta nella perdita delle funzioni della proteina stessa. Mentre le proteine moderatamente carbonilate sono indirizzate al proteasoma e degradate, quelle altamente carbonilate tendono a formare aggregati ad alto peso molecolare che si accumulano all'interno della cellula [110]. Il DNA è particolarmente vulnerabile al danno ossidativo che determina la modificazione delle basi, l'ossidazione del deossiribosio, la rottura del filamento, la formazione di *cross-link* proteici. L'ossidazione delle basi azotate può indurre errori nel processo di duplicazione, che, se non corretti dai sistemi di riparazione, possono trasformarsi in una mutazione stabile [111]. I lipidi sono molto più reattivi nei confronti delle ROS rispetto ad acidi nucleici e proteine, perché presentano siti di insaturazione nei doppi legami carbonio-carbonio. Il radicale idrossile (OH^{\bullet}) può reagire con la catena carboniosa del fosfolipide estraendo un atomo di idrogeno e formando un radicale

centrato sul carbonio in una reazione nota con il nome di perossidazione lipidica. Una volta danneggiato irreversibilmente, il lipide viene degradato enzimaticamente e risintetizzato per riparare la membrana. Quanto maggiore sarà l'entità del danno perossidativo, tanto minore sarà la capacità della cellula di riparare prontamente la membrana [111].

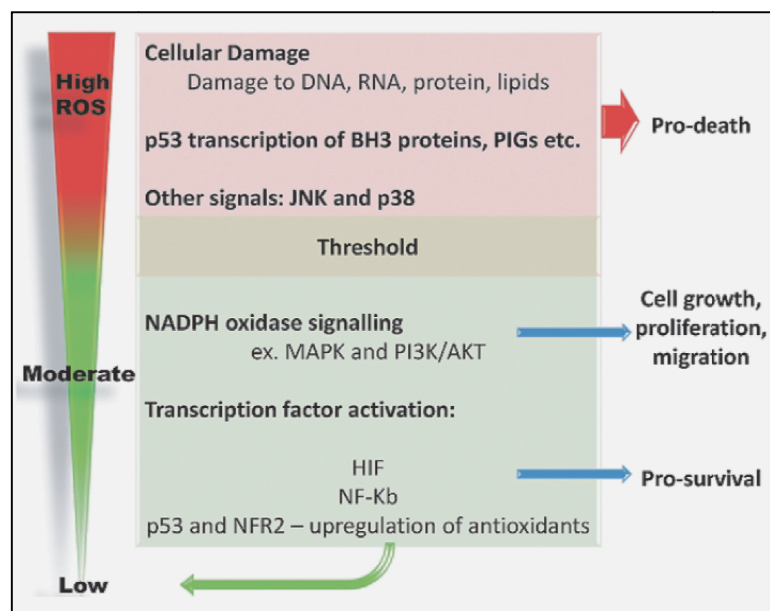


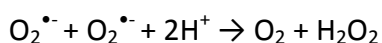
Figura 10. I livelli intracellulari di ROS sono coinvolti nella regolazione dei fenomeni di sopravvivenza e morte cellulare. Un aumento moderato delle ROS determina l'attivazione di pathway di sopravvivenza, mentre un incremento eccessivo è associato a un esteso danno a carico di lipidi, proteine e acidi nucleici e all'induzione del processo di morte cellulare. La produzione di una moderata quantità di ROS da parte della NADPH ossidasi risulta nell'attivazione della vie delle MAPK (chinasi attivate dai mitogeni) e del PI3K/AKT (fosfoinositolo 3 chinasi/Akt) per il controllo di crescita, proliferazione e migrazione cellulare. Livelli moderati di ROS attivano anche i fattori di trascrizione Nrf2 e NF-kB. Nrf2 regola l'espressione di numerosi proteine antiossidanti, come le SOD, la GPx, la perossiredossina. NF-kB induce la trascrizione di geni codificanti per proteine antiapoptotiche, come XIAP e GADD45. Dipendentemente dai livelli di ROS intracellulari, la proteina p53 può mediare segnali di sopravvivenza o morte cellulare: bassi livelli di ROS sono associati alla trascrizione di geni codificanti per gli enzimi antiossidanti, alti livelli di ROS inducono invece l'attivazione di proteine proapoptotiche come BH3. Alti livelli di ROS sono anche associati all'attivazione delle chinasi p38 e JNK (c-jun N-terminal kinase), coinvolte nella regolazione dei segnali apoptotici. Patten, *J Alzheimer Dis* 2010;20:S357-S367 [109].

La principale fonte di ROS intracellulari è rappresentata dalla catena respiratoria. È stato stimato che durante la respirazione l'1-2% dell'ossigeno non viene completamente convertito ad acqua, ma solo parzialmente ridotto producendo l'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), che può essere poi convertito in perossido di idrogeno (H_2O_2) e in radicale idrossile (OH^{\bullet}). I principali siti di produzione di $O_2^{\bullet-}$ sono localizzati a livello dei complessi I e III della catena di

trasporto degli elettroni (ETC), dai quali gli elettroni sfuggono riducendo direttamente l'ossigeno molecolare. Le ROS generate a livello della ETC non esplicano la loro azione tossica solo nei mitocondri, ma anche nel compartimento citosolico. Il perossido di idrogeno è infatti una specie altamente diffusibile e abbandona rapidamente la matrice riversandosi anche nel citosol [112].

2.3.2. Sistemi antiossidanti endogeni

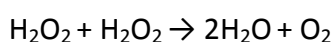
La superossido dismutasi (SOD) (EC 1.15.1.1) è uno dei sistemi antiossidanti enzimatici più efficaci; essa catalizza la conversione dell'anione superossido in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno nella seguente reazione di dismutazione:



La SOD è presente in diverse isoforme, identificabili in base agli ioni presenti nel sito attivo, alla composizione amminoacidica e alla distribuzione nei compartimenti cellulari. Nelle cellule umane sono state identificate tre isoforme: la SOD1 (CuZn-SOD) rappresenta l'isoforma citosolica, la SOD2 (Mn-SOD) è localizzata a livello mitocondriale, la SOD3 (CuZn-SOD) è invece l'isoforma extracellulare [113].

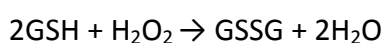
Il perossido di idrogeno, derivante dalla reazione di dismutazione, rappresenta ancora una specie reattiva. Gli enzimi principalmente deputati alla sua rimozione sono la catalasi e la glutazione perossidasi.

La catalasi (Cat) (EC 1.11.1.6) è un enzima presente nei perossisomi e catalizza la conversione del perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno molecolare nella seguente reazione:



La Cat è uno degli enzimi con il più alto numero di turnover: una molecola di catalasi può convertire circa sei milioni di molecole di perossido di idrogeno in un minuto [114].

La glutazione perossidasi (GPx) (EC 1.11.1.9) compete con la catalasi per la rimozione del perossido di idrogeno e rappresenta la maggiore fonte di protezione verso bassi livelli di stress ossidativo [115]. La GPx catalizza la conversione del perossido di idrogeno o di un perossido organico (ROOH) ad acqua o alcol (R-OH) mediante l'utilizzo del glutazione come agente riducente.



Il glutatione è il più potente antiossidante endogeno non enzimatico. Esso è un tripeptide (cisteina-glicina-glutammato) presente in grandi quantità nel citosol, nel nucleo e nei mitocondri. Quando il glutatione (GSH) viene utilizzato durante le reazioni di detossificazione dai perossidi, due molecole di GSH ridotto vengono ossidate formando un ponte disolfuro (GS-SG) [116]. In condizioni fisiologiche, il glutatione ossidato costituisce circa l'1% del glutatione totale; variazioni nel rapporto GSH/GSSG rappresentano un indice dello stato di stress ossidativo [117].

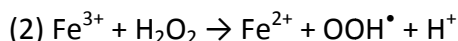
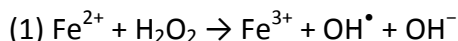
2.3.3. I mitocondri sono la principale fonte di ROS nell'AD

Numerose evidenze hanno dimostrato la rilevanza dello stress ossidativo, nonché della disfunzione mitocondriale ad esso associata, nella neurodegenerazione e in particolare nella patogenesi della AD. I neuroni sono particolarmente esposti al danno ossidativo. L'elevata domanda energetica viene soddisfatta da un metabolismo prevalentemente ossidativo, al quale è associato un sostenuto consumo di ossigeno (20-30% dell'ossigeno consumato dall'organismo) e una conseguente produzione di grandi quantità di ROS. Inoltre, nel sistema nervoso i livelli dei sistemi antiossidanti endogeni sono più bassi rispetto a quelli di altri tessuti e le membrane contengono alti livelli di acidi grassi polinsaturi [118]. Queste condizioni rendono i neuroni estremamente suscettibili al danno mediato dalle ROS.

Nella AD il metabolismo mitocondriale è profondamente alterato. L'attività degli enzimi piruvato deidrogenasi, α -chetoglutarato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi e citocromo c ossidasi è ridotta e ciò sostiene maggiormente la produzione di ROS a livello della catena di trasporto degli elettroni. Il danno ossidativo è ulteriormente esacerbato dall'alterazione dell'attività degli enzimi antiossidanti. Si ritiene che nei neuroni di soggetti AD l'attività della catalasi diminuisca, risultando in un aumento del rapporto SOD/Cat. Per effetto di questo squilibrio la concentrazione citosolica di perossido di idrogeno aumenterebbe sensibilmente [119].

2.3.4. Il metabolismo di Cu^{2+} e Fe^{2+} è alterato nell'AD

Il radicale idrossile (OH^\bullet) può essere generato mediante la reazione di Fenton, nella quale sono coinvolti un metallo di transizione (generalmente Cu^{2+} o Fe^{2+}) e il perossido di idrogeno:



Nei pazienti AD l'omeostasi del ferro e del rame è alterata e risulta in un accumulo dei due metalli a livello citosolico, con il conseguente potenziamento della produzione di ROS (OH^\bullet e OOH^\bullet) mediante la reazione di Fenton. La presenza dei metalli è inoltre associata all'aumento del processo di fibrillogenesi. All'interno delle placche senili è stata infatti riscontrata una elevata concentrazione sia di rame che di ferro. In particolare, le fibrille di $\text{A}\beta$ sono in grado di legare il rame formando dei complessi $\text{A}\beta:\text{Cu}$ a livello dei quali viene generato radicale idrossile [120].

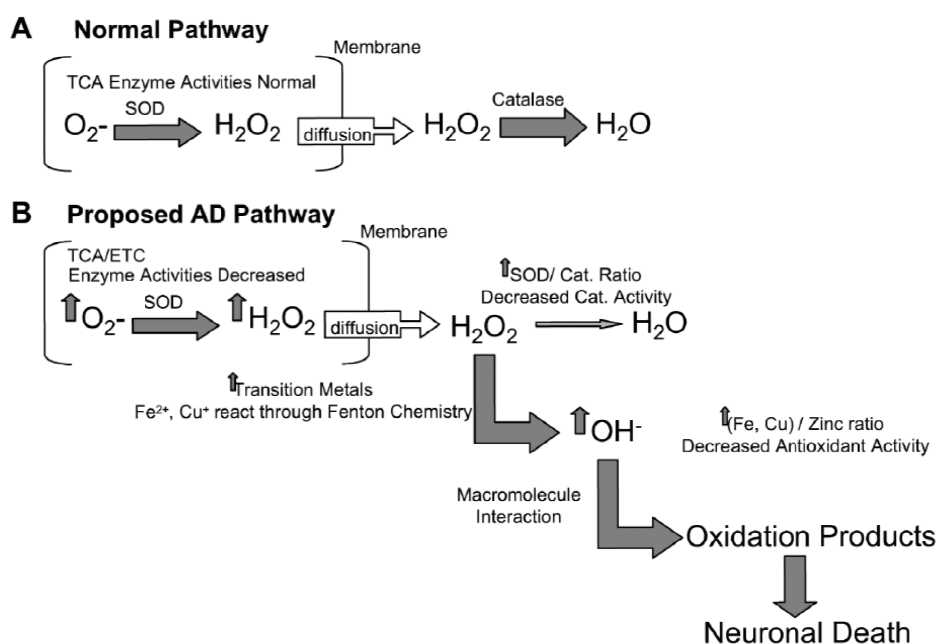


Figura 11. Meccanismo del danno ossidativo citosolico nella AD. In condizioni fisiologiche (A), l'anione superossido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) prodotto a livello mitocondriale viene rimosso dalla superossido dismutasi (SOD) producendo il perossido di idrogeno (H_2O_2); H_2O_2 diffonde nel citosol, dove viene poi definitivamente eliminato dalla catalasi. Nei neuroni dei soggetti AD (B), si verifica un aumento della produzione mitocondriale di $\text{O}_2^{\bullet -}$ e una concomitante riduzione dei meccanismi antiossidanti. La riduzione dell'attività della catalasi si traduce nella riduzione del rapporto catalasi/SOD, che determina un incremento dei livelli citosolici di H_2O_2 . Inoltre, H_2O_2 viene convertito in specie radicaliche altamente reattive (OH^\bullet e OOH^\bullet) attraverso la reazione di Fenton, la quale risulta potenziata dall'aumento delle concentrazioni citosoliche di Cu^{2+} o Fe^{2+} . Su, *Curr Alzheimer Res* 2008;5(6):525-532 [120].

2.3.5. L'attivazione di microglia e astrociti contribuisce allo stress ossidativo nell'AD

L'accumulo extracellulare del peptide A β determina l'attivazione della microglia e degli astrociti, che sostengono uno stato infiammatorio producendo grandi quantità di ROS attraverso diversi meccanismi. Il peptide A β , per esempio, può attivare direttamente la NADPH ossidasi della microglia, determinando la produzione di O $_2^{\bullet-}$ e H $_2$ O $_2$. Anche la mieloperossidasi gliale, la cui espressione sembra attivata dalla presenza di aggregati di A β [121], contribuisce al danno ossidativo catalizzando la formazione dello ione ipoclorito (ClO $^-$) e del radicale idrossile (OH $^{\bullet}$) [122].

2.4. L'ipotesi vascolare

L'ipotesi vascolare sostiene che la AD sia una conseguenza diretta dell'invecchiamento e della presenza di fattori di rischio vascolare, i quali determinano una riduzione del flusso ematico cerebrale (FEC). La derivante ipoperfusione neuronale dà origine a una complessa serie di alterazioni metaboliche, quali la disfunzione mitocondriale, lo stress ossidativo, la riduzione della disponibilità energetica, l'aumento del calcio intracellulare, l'alterazione delle pompe ioniche, la *downregulation* della trasduzione del segnale, l'inefficienza della neurotrasmissione [123]. Tutti questi fattori contribuiscono a sostenere il processo di danno neuronale da cui dipende il progressivo declino cognitivo caratteristico dei pazienti AD.

È noto che le malattie cerebro- e cardio-vascolari rappresentino uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo della AD [124, 125]. È stato inoltre dimostrato che alti livelli di colesterolo sono associati al potenziamento della via amiloidogena e che farmaci bloccanti la sintesi del colesterolo riducono la sintesi di A β in modelli animali [126]. Queste evidenze, unitamente all'identificazione della variante allelica ApoE4 come fattore genetico predisponente allo sviluppo dell'AD sporadico [127], sostengono il ruolo dei fattori di rischio vascolare nella patogenesi dell'AD.

Ad ulteriore sostegno della validità dell'ipotesi vascolare vi è l'evidenza che i vasi cerebrali costituiscono uno dei siti di accumulo del peptide A β e di formazione delle placche senili.

La AD è quasi sempre associata ad un esteso danno vascolare dovuto alla deposizione del peptide A β a livello dei piccoli vasi cerebrali, lesione nota come angiopatia amiloide cerebrale [128, 129]. L'accumulo del peptide A β nel citoplasma delle cellule endoteliali vasali

e a livello perivascolare può risultare nell'alterazione della funzionalità della barriera ematoencefalica (BEE), evento che caratterizza le fasi sia di insorgenza che di progressione della AD [130]. Si ritiene che le lesioni vascolari siano poi associate a una riduzione del flusso ematico cerebrale, che determina a sua volta una ipoperfusione cronica delle aree del sistema nervoso interessate dal danno [131].

Alla produzione e all'accumulo del peptide A β sono dunque da addebitarsi sia la tossicità neuronale, evento cruciale dell'ipotesi della proteina amiloide, sia quella a carico dei vasi, che contribuisce a sostenere l'ipotesi vascolare. Sulla base di questa duplice natura tossica della A β è stata formulata una nuova ipotesi di patogenesi per la AD, detta ABSENT (*Amyloid Beta Synergistic Endothelial and Neuronal Toxicity*). Secondo questa ipotesi il danno neuronale e quello vascolare agirebbero in maniera sinergica potenziando i meccanismi responsabili del processo neurodegenerativo [132] (figura 12).

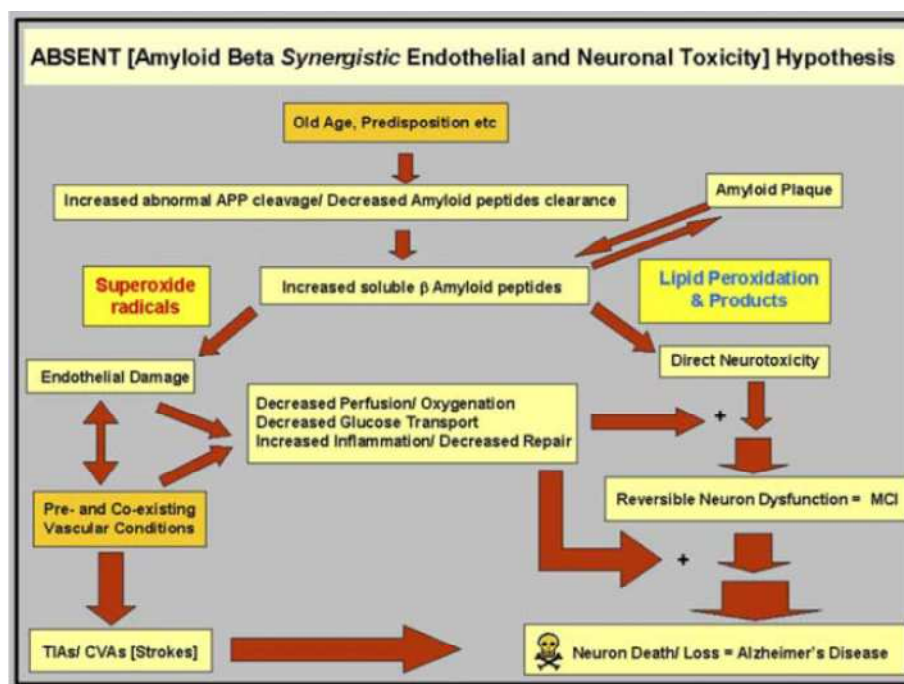


Figura 12. L'ipotesi ABSENT. L'accumulo del peptide A β è responsabile dell'aumentata produzione di ROS, principale fonte di danno sia per i neuroni che per le cellule dell'endotelio vascolare. Il danno vascolare e quello neuronale agiscono in maniera sinergica, accelerando il processo neurodegenerativo. Fattori predisponenti o malattie vascolari coesistenti potenziano il danno indotto dall'accumulo del peptide A β . Secondo questa ipotesi, l'alterazione vascolare si verifica nella prima fase della patologia, quando compaiono i primi sintomi clinici tipici del decadimento cognitivo lieve. Nella fase più avanzata della patologia, al danno vascolare si associa anche la disfunzione neuronale irreversibile. Roy, *Medical Hypotheses* 2005;65:123–137 [132].

3. L'ipossia

3.1. HIF-1 e i meccanismi di adattamento metabolico all'ipossia

Con il termine ipossia si definisce una condizione caratterizzata dalla riduzione della disponibilità di ossigeno. La pressione parziale dell'ossigeno nell'atmosfera (pO_2 21%) corrisponde approssimativamente a una concentrazione di 200 μM . Tuttavia le cellule sono esposte *in vivo* a una pressione parziale di ossigeno più bassa, che dipende dal tipo di tessuto e dallo stato fisiologico della cellula e che è stata stimata essere circa uguale a pO_2 5% (46 μM). Pertanto viene considerata ipossia una condizione per la quale le cellule sperimentano una pO_2 compresa tra 0.5 e 5%, corrispondente a una concentrazione di ossigeno compresa tra 0.46 e 46 μM [133].

I mitocondri consumano circa l'85-90% dell'ossigeno presente nella cellula nel processo della fosforilazione ossidativa (OXPHOS), che rappresenta la principale via di produzione dell'ATP. Gli equivalenti riducenti trasportati dal NADH e dal $FADH_2$ vengono rilasciati rispettivamente a livello dei complessi I e II e trasferiti lungo la catena di trasporto degli elettroni, generando un gradiente protonico utilizzato per la sintesi dell'ATP. L'ossigeno ha un ruolo fondamentale in questo processo, in quanto rappresenta l'accettore finale degli elettroni.

Pertanto, la riduzione della disponibilità di ossigeno influenza primariamente il metabolismo mitocondriale. Secondo molti studi riportati in letteratura, l'ipossia determina l'aumento della produzione di ROS, i quali agiscono sia da mediatori nel processo di segnalazione cellulare che da induttori di danno ossidativo. L'ipossia determina anche la riduzione del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa e induce la generazione di NO, determinando complessivamente la riduzione della velocità di trasporto degli elettroni, a cui segue la riduzione del potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$) (figura 13) [133].

Quando le cellule sono esposte a una condizione di ipossia prolungata mettono in atto una serie di processi di adattamento metabolico mediati da HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor 1*), fattore di trascrizione descritto per la prima volta da Semenza e Wang [134]. HIF-1 è un eterodimero costituito dalle subunità HIF-1 α e HIF1- β . In condizioni di normale ossigenazione, la subunità HIF-1 α è continuamente sintetizzata e degradata a livello del proteasoma, impedendo la formazione del dimero e l'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1. Il meccanismo molecolare attraverso cui l'ossigeno regola la degradazione di HIF-1 α

coinvolge l'idrossilazione di due proline (Pro⁴⁰² e Pro⁵⁶⁴ nell'HIF-1 α umano). Una ossigenasi utilizza una molecola di O₂ e una di α -chetoglutarato come substrati di una reazione in cui un atomo di ossigeno è inserito su una prolina e l'altro è usato per convertire l' α -chetoglutarato in succinato. In seguito all'idrossilazione di una o di entrambe le proline, HIF-1 α interagisce con la proteina von Hippel-Lindau, membro del complesso E3 della ubiquitina ligasi. In condizioni normossiche HIF-1 α viene quindi rapidamente idrossilato, ubiquitinato e degradato. In condizioni di ipossia, la reazione di idrossilazione di HIF-1 α è inibita dalla ridotta disponibilità di O₂, risultando nella stabilizzazione di HIF-1 α , nella dimerizzazione con HIF-1 β e nell'attivazione di HIF-1 [135].

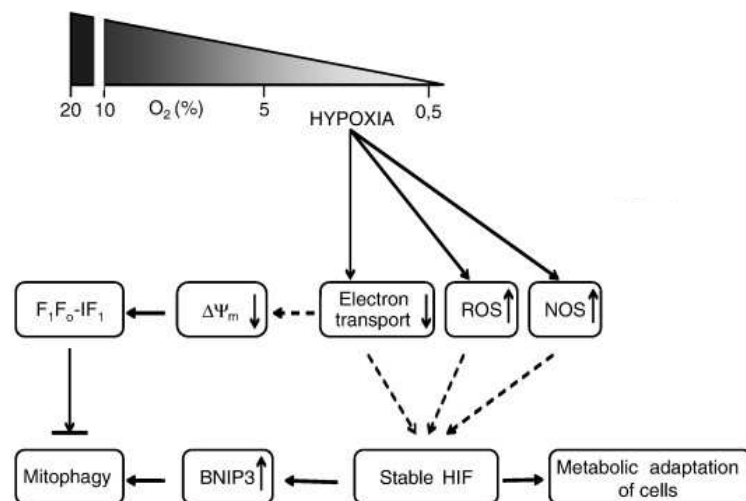


Figura 13. Alterazioni del metabolismo mitocondriale in ipossia. L'ipossia induce l'aumento della produzione di ROS, l'attivazione della NO sintasi e la riduzione della velocità del trasporto degli elettroni, determinando un calo del potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$). La riduzione di $\Delta\Psi_m$ influenza l'attività della F_1F_o -ATPasi che può lavorare in modo inverso. La F_1F_o -ATPasi può infatti idrolizzare l'ATP e utilizzare l'energia rilasciata per pompare protoni dalla matrice allo spazio intermembrana, con lo scopo di mantenere valori fisiologici di $\Delta\Psi_m$. La reazione di idrolisi dell'ATP da parte dell'ATP sintasi è una delle cause della riduzione del contenuto intracellulare di ATP in ipossia. L'attività dell'ATP sintasi è strettamente regolata per evitare la deplezione dell'ATP. IF_1 è una proteina che si lega alla porzione F_1 in condizioni di ridotto $\Delta\Psi_m$ e basso pH, determinando l'inibizione reversibile dell'ATP sintasi e preservando i livelli di ATP in ipossia. L'espressione di IF_1 indotta dall'ipossia sembrerebbe inoltre essere correlata ad una riduzione del processo autofagico. L'ipossia determina l'attivazione del fattore HIF1, responsabile degli adattamenti metabolici all'ipossia e dell'induzione della mitofagia. Solaini, BBA 2010;1797:1171-1177 [133].

HIF-1 regola la trascrizione di numerosi geni, molti dei quali codificanti per proteine coinvolte nell'adattamento metabolico all'ipossia. HIF-1 aumenta la trascrizione dei geni codificanti per i trasportatori del glucosio e degli enzimi della glicolisi, determinando l'aumento della attività glicolitica con lo scopo di compensare il calo della sintesi di ATP associato alla riduzione dell'efficienza della OXPHOS [135]. Inoltre, il metabolismo del piruvato risulta profondamente alterato in ipossia, dal momento che la sua conversione ad acetil-CoA è fortemente ridotta. Questo cambiamento metabolico è regolato dall'HIF-1 attraverso l'aumento dell'espressione degli enzimi piruvato deidrogenasi chinasi (PDK1) e lattico deidrogenasi A (LDHA). La PDK1 fosforila e inibisce la subunità catalitica della piruvato deidrogenasi (PDH), riducendo la conversione del piruvato ad acetil-CoA; la LDHA converte il piruvato in lattato ossidando il NADH generato durante la glicolisi. L'upregolazione coordinata di LDHA e PDK1 risulta quindi nell'aumento della produzione di lattato e nella riduzione della sintesi di acetil-CoA. Il calo dei livelli di acetil-CoA determina la riduzione dell'attività del ciclo degli acidi tricarbossilici e, conseguentemente, la riduzione del flusso di elettroni attraverso la catena di trasporto [136]. Recentemente è stato identificato un altro meccanismo attraverso cui HIF1 potrebbe ridurre il trasporto degli elettroni. HIF1 attiva infatti la trascrizione di miR-210, un microRNA che blocca l'espressione delle proteine ISCU1/2, necessarie per la funzione dell'enzima aconitasi e del complesso I [137].

L'adattamento metabolico mediato da HIF1 passa anche attraverso la regolazione dell'attività della COX. La COX è un dimero, in cui ciascun monomero è costituito da 13 subunità. Le subunità catalitiche COX1, COX2 e COX3 sono codificate dal genoma mitocondriale, mentre le altre dieci subunità sono codificate dal genoma nucleare e detengono una funzione di regolazione. In condizioni ipossiche si verifica un cambiamento nella composizione della COX mediato da HIF-1. Le cellule esprimono normalmente l'isoforma 1 della subunità COX4 (COX4-1), che lavora in maniera ottimale in condizioni di normale ossigenazione. In condizioni ipossiche, l'isoforma COX4-1 viene degradata dalla proteasi mitocondriale LON (la cui espressione è aumentata in ipossia da HIF-1) e sostituita dall'isoforma COX4-2, che ottimizza l'attività della COX in presenza di limitata disponibilità di ossigeno. Il cambiamento di isoforma è un meccanismo messo in atto per mantenere l'efficienza della respirazione e potrebbe rappresentare uno dei meccanismi di adattamento iniziale all'ipossia [135, 136]. Un altro importante regolatore dell'attività della COX è l'ossido nitrico (NO). La NO sintasi inducibile è un target di HIF1 e la sua attività viene indotta in

ipossia [138], risultando nell'aumento della produzione di NO. NO compete con l'ossigeno per il legame alla COX, la cui attività viene quindi inibita.

HIF-1 attiva inoltre la trascrizione del gene codificante per la proteina BNIP3 coinvolta nel processo di autofagia mitocondriale, evento necessario a prevenire l'incremento dei livelli di ROS e la morte cellulare [139].

Considerati complessivamente i meccanismi di adattamento all'ipossia mediati da HIF-1 si traducono nella riduzione della fosforilazione ossidativa e nella conseguente riduzione della produzione di ROS, eventi fondamentali per il controllo dell'omeostasi ossidoriduttiva della cellula [140].

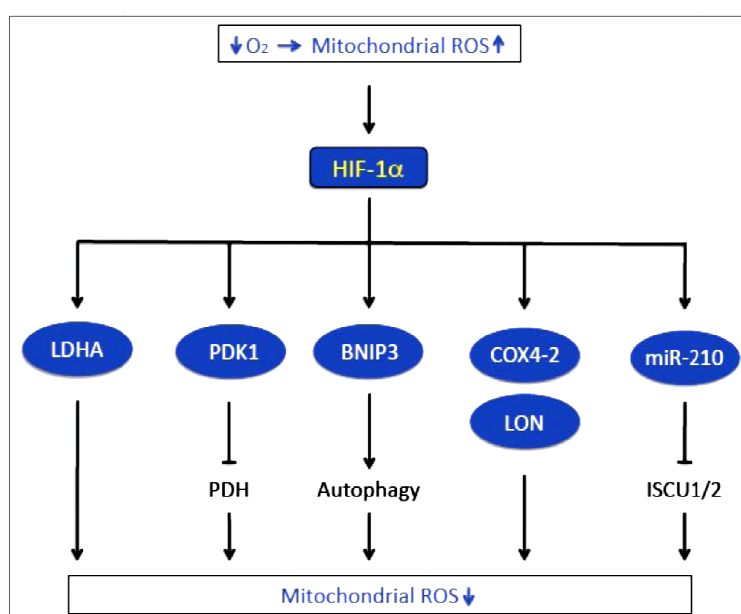


Figura 14. Regolazione del metabolismo mitocondriale da parte di HIF1. L'ipossia determina l'aumento della produzione di ROS e l'attivazione del fattore HIF1. HIF1 attiva la trascrizione dei geni codificanti per la lattico deidrogenasi A (LDHA), la piruvato deidrogenasi chinasi α (PDK1) che inibisce a sua volta la piruvato deidrogenasi (PDH), la proteina BNIP3 coinvolta nella regolazione della mitofagia, e attiva infine la trascrizione del microRNA miR-210. I meccanismi di adattamento attivati da HIF1 si traducono complessivamente nella riduzione della fosforilazione ossidativa e nella riduzione della produzione di ROS. Semenza, BBA 2010;1813(7):1263-8 [140].

3.2. Ruolo patologico dell'ipossia nell'AD

Negli ultimi anni è risultato sempre più evidente il coinvolgimento della componente vascolare nello sviluppo della malattia di Alzheimer. Nei pazienti AD è stata documentata una significativa riduzione del flusso ematico cerebrale, dimostrando che in questi soggetti si verificano condizioni di ridotta disponibilità di ossigeno [141]. Numerosi studi hanno poi

dimostrato che ischemie - anche di breve durata - aumentano il rischio di demenza [142, 143] e che l'ipossia neuronale, diretta conseguenza dell'ipoperfusione, è un significativo fattore di rischio per lo sviluppo dell'AD [144].

Recentemente è stato dimostrato che l'ipossia è intimamente connessa con il processi di accumulo del peptide A β , fenomeno responsabile della formazione delle placche senili. È stato infatti dimostrato che l'HIF-1 aumenta l'espressione di BACE1 [145,146] e di APH-1, componente della γ -secretasi [147]. In particolare, è stato ipotizzato che l'attivazione di BACE1 sia dovuta, nella prima fase del danno ipossico, alla produzione di ROS da parte dei mitocondri e, successivamente, a un aumento della trascrizione indotta da HIF-1 in risposta all'ipossia. Lo stress ossidativo associato all'ipossia è anche correlato all'aumento dell'espressione di PSEN1, che costituisce la componente catalitica della γ -secretasi [148,149]. Anche i livelli della proteina APP sembrano essere influenzati dall'ipossia, risultando aumentati in condizioni post-ischemiche [150]. In un recente lavoro è stato riportato che l'aumento coordinato dell'espressione di BACE1, PSEN e APP in risposta all'ipossia e allo stress ossidativo rappresenti un *pathway* conservato dal punto di vista evolutivo, suggerendone un originario ruolo di protezione nei confronti dello stress ossidativo [151].

Si ritiene inoltre che l'ipossia sia in grado di ridurre la degradazione del peptide A β [152]. La neprilina (NEP) e l'enzima che converte l'endotelina (ECE) sono due delle proteasi per le quali è stato dimostrata la capacità di degradare la A β [153]. I livelli di questi enzimi sembrano essere sensibilmente ridotti in seguito ad eventi ischemici e all'esposizione a condizioni ipossiche [154]. L'ipossia sembra dunque partecipare direttamente alla patogenesi dell'AD potenziando la via amiloidogenica e favorendo la formazione delle placche senili.

Un'altra via attraverso la quale l'ipossia sostiene la patogenesi dell'AD, sembrerebbe essere il suo coinvolgimento nei processi di iperfosforilazione della proteina tau, i cui aggregati danno origine agli ammassi neurofibrillari. Sebbene la causa della fosforilazione anomala di tau non sia pienamente compresa, si ritiene che essa derivi da un'alterazione delle attività di chinasi e fosfatasi. L'attività delle glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK-3 β) e della chinasi ciclina-dipendente 5 (Cdk5), enzimi coinvolti nella iperfosforilazione della proteina tau, è aumentata dall'ipossia [155], promuovendo così il fenomeno della formazione degli ammassi neurofibrillari.

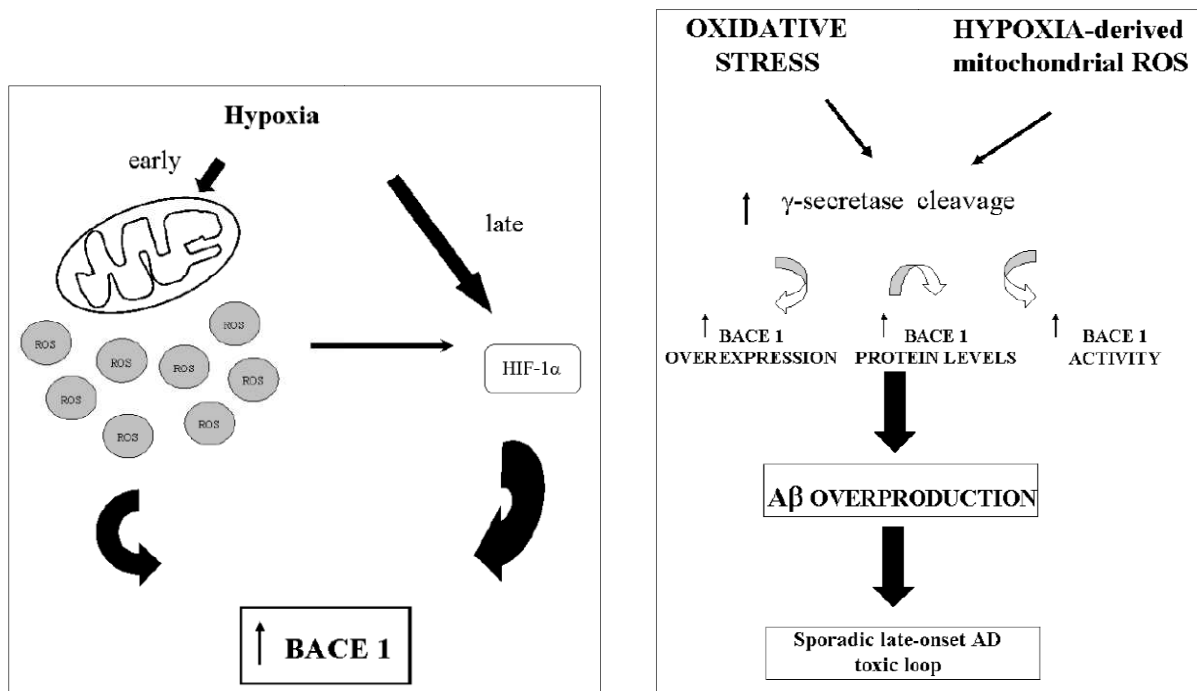


Figura 15. L'ipossia partecipa alla patogenesi dell'AD potenziando la via amiloidogena. L'aumento dell'espressione e dell'attività di BACE1 è mediata dalla produzione di ROS da parte dei mitocondri nella prima fase del danno ipossico e, in una fase successiva, da HIF-1. Lo stress ossidativo indotto dall'ipossia è in grado di determinare un aumento dell'attività della γ -secretasi aumentando l'espressione di PSEN1, componente responsabile dell'attività enzimatica. L'espressione di BACE1 è inoltre regolata dall'attività della γ -secretasi stessa, dimostrando l'esistenza di un feedback positivo tra i due enzimi. Il risultato di questi eventi è l'incremento della produzione del peptide A β . Guglielmotto, Scientific World Journal 2009;9:781-791 [148].

4. Molecole ad azione protettiva e antiossidante

4.1. Strategie terapeutiche nell'AD

La neurodegenerazione dell'AD interessa prevalentemente i neuroni colinergici delle aree cerebrali coinvolte nel controllo dei processi di apprendimento e memoria. Attualmente le strategie terapeutiche approvate consistono nella somministrazione di inibitori della acetilcolinesterasi (AChEI) e della memantina, che agiscono rispettivamente ripristinando i livelli della trasmissione colinergica e glutammatergica, entrambe compromesse nell'AD. Gli AChEI inibiscono la degradazione enzimatica dell'acetilcolina, aumentandone il tempo di permanenza nello spazio sinaptico; mentre la memantina, antagonista non competitivo del recettore NMDA, agisce riducendo la trasmissione mediata dal glutammato (eccitotossicità da glutammato). Questi farmaci mostrano un'efficacia limitata nel tempo, riducono i sintomi

ma non interferiscono con la progressione della patologia. Pertanto, negli ultimi anni sono state studiate nuove vie terapeutiche che agiscono interferendo con le cause della patologia, in particolar modo con la via amiloidogena. In fase di sperimentazione clinica sono, per esempio, i farmaci ipoglicemizzanti orali, come il rosiglitazone e il pioglitazone, e nuovi composti anti-aggreganti che legano la A β . I primi agiscono riducendo l'attività dell'enzima BACE1 e l'espressione di APP [156], i secondi prevenendo l'oligomerizzazione del peptide A β [157].

Un ulteriore approccio terapeutico consiste nella somministrazione di farmaci antiinfiammatori, che interferirebbero con l'attivazione di astrociti e microglia e con la secrezione di citochine proinfiammatorie. Tuttavia, gli antiinfiammatori attualmente in uso non sembrano essere dotati di un grande potenziale terapeutico per la AD [23].

Lo studio continuo sui processi patogenetici dell'AD ha messo in evidenza il ruolo critico della disfunzione mitocondriale, evidenziandone il coinvolgimento sin dalle fasi precoci della patologia. Sulla base di questa evidenza, negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta allo studio di farmaci protettivi della funzionalità mitocondriale, facendo dei mitocondri il nuovo target per la terapia dell'AD [158].

È stato dimostrato che lo stress ossidativo prende parte sia alla fase di insorgenza che a quella di progressione della patologia. Livelli aumentati di *biomarkers* indicatori di stress ossidativo sono stati riscontrati sia nelle regioni cerebrali interessate dalla patologia che nei tessuti periferici di pazienti AD. Inoltre, alcuni studi hanno evidenziato una riduzione della concentrazione plasmatica di micronutrienti ad azione antiossidante nei soggetti affetti da AD [159]. Pertanto, le molecole con proprietà antiossidanti hanno ricevuto grande attenzione, perché potenzialmente utili nel trattamento o anche nella prevenzione della AD. L'uso dell' α -tocoferolo, la forma di vitamina E con la più alta biodisponibilità nell'uomo, è stato valutato in diverse patologie caratterizzate dall'aumento dello stress ossidativo, come la AD, la malattia di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica [160]. Tuttavia, i risultati ottenuti nei *trials* clinici non sono particolarmente promettenti. Tale mancanza di efficacia è stata giustificata con la breve durata della somministrazione e lo stato troppo avanzato della patologia [161]. Il coenzima Q₁₀ (ubichinone) è un altro antiossidante studiato per la terapia delle malattie neurodegenerative. Il coenzima Q₁₀ è in fase III di sperimentazione clinica per la terapia delle malattie di Parkinson e di Huntington e si è inoltre dimostrato efficace nel

ridurre i livelli corticalali di $A\beta_{1-42}$ e livelli di indicatori di stress ossidativo in un modello murino di AD [162].

Le molecole ad azione antiossidante o protettiva della funzionalità mitocondriale potrebbero rappresentare una valida strategia terapeutica per il trattamento dell'AD. La sfida futura sarà quella di identificare molecole per le quali il mitocondrio rappresenta il target d'elezione, capaci quindi di attraversare la barriera ematoencefalica, la membrana plasmatica e concentrarsi a livello mitocondriale.

4.2. Molecole ad azione protettiva inserite nella sperimentazione

Nel nostro studio abbiamo analizzato gli effetti del trattamento con molecole ad azione antiossidante e protettiva della funzionalità mitocondriale in cellule esposte all'ipossia e al peptide $A\beta$. Basandoci sulle evidenze presenti in letteratura, abbiamo deciso di introdurre nella nostra sperimentazione una serie di composti, tra cui l'idebenone, l'oleato, la spermina, il trolox.

4.2.1. Idebenone

L'idebenone (2,3-dimetossi-5-metil-6-(10-idrossidecil)-1,4-benzoquinone) è un analogo sintetico del coenzima Q_{10} con proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e protettive in condizioni di ridotta disponibilità di ossigeno. L'idebenone previene la formazione delle ROS sia nel citosol che nei mitocondri, riduce l'ossidazione delle proteine mediata dalle ROS e riduce la perossidazione lipidica, proteggendo le membrane dal danno ossidativo [163]. Nella sua forma ridotta, l'idebenone mostra anche un'attività antiinfiammatoria; inibisce il metabolismo dell'acido arachidonico a livello delle cellule astro gliali, agendo sulla ciclossigenasi e sulla lipossigenasi.

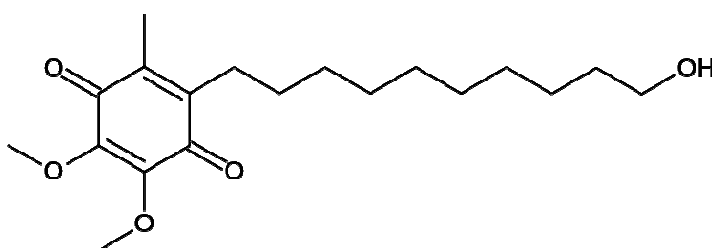


Figura 16. Struttura chimica dell'idebenone.

Essendo un analogo del coenzima Q₁₀, può anche agire da trasportatore di elettroni a livello della catena di trasporto, trasferendo gli elettroni dal complesso I e II al complesso III. In modelli animali sottoposti a ischemia cerebrale, la somministrazione di idebenone inibisce la perdita di acetilcolina, previene l'aumento del lattato e preserva il contenuto di ATP nella corteccia cerebrale. È stato inoltre dimostrato che l'idebenone stimola l'NGF (*Nerve Growth Factor*), una proprietà importante per il trattamento delle malattie neurodegenerative [163].

4.2.2. Acido oleico

L'acido oleico (acido cis-9-ottadecenoico) è un acido carbossilico monoinsaturo a 18 atomi di carbonio della serie omega-9; essendo un componente dei fosfolipidi è presente in strutture biologiche come le membrane cellulari e le lipoproteine. La principale fonte alimentare dell'acido oleico è rappresentata dall'olio d'oliva, del quale costituisce il componente maggioritario. In modelli di aterogenesi costituiti da cellule di epitelio in coltura, è stato osservato che l'acido oleico è in grado di ridurre l'espressione di molecole di adesione cellulare, la produzione di citochine tipicamente secrete nella fase di attivazione endoteliale per il reclutamento dei monociti e di ridurre la produzione di ROS, suggerendo un effetto ateroprotettivo [164, 165]. Da una recente pubblicazione è inoltre emerso il potenziale ruolo protettivo dell'acido oleico nei processi cellulari relativi alla patogenesi dell'AD. In un modello murino di AD, la somministrazione di acido oleico è associato a ridotti livelli di peptide A β , ridotto numero di placche, ridotta espressione di BACE1 e aumento dei livelli del peptide neuroprotettivo sAPP α [166].

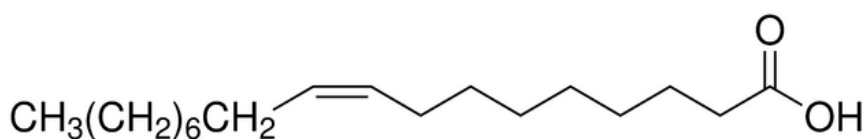


Figura 17. Struttura chimica dell'acido oleico.

4.2.3. Spermina

La spermina (N,N'-bis(3-amminopropil)butil-1,4-diammina) è una poliammina naturale che a pH fisiologico si presenta in forma policationica. Le poliammide sono coinvolte nel controllo

dei processi di trascrizione genica e sintesi proteica, nella stabilizzazione degli acidi nucleici e nella regolazione della crescita e della differenziazione cellulare [167].

È stato dimostrato che la spermina si accumula a livello dei mitocondri. Essa si lega alla membrana mitocondriale interna aumentando l'attività del complesso ATPasi [168, 169], regola il trasporto del Ca^{2+} , attiva la piruvato deidrogenasi e la citrato sintasi, inibisce l'idrolisi dell'ATP da parte della FoF_1 -ATPasi e preserva i livelli intracellulari di ATP [170]. È inoltre dotata di un'attività antiossidante diretta ed esplica un'azione neuroprotettiva nei confronti del danno indotto da ipossia/ischemia [171]. Queste azioni protettive della funzionalità mitocondriale rendono la spermina una molecola dal grande potenziale nella terapia delle malattie neurodegenerative.

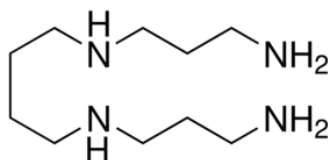


Figura 18. Struttura chimica della spermina.

4.2.4. Trolox

Il trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcromanol-2-carbossilico) è un analogo idrosolubile della vitamina E. Vitamina E è il nome generico per indicare tutti i derivati tocoferolici e tocotrienolici, tra i quali l' α -tocoferolo costituisce la forma vitaminica più attiva. La vitamina E è un composto liposolubile dotato di una potente azione antiossidante, della quale è responsabile l'anello cromanolico; agisce da *scavenger* nei confronti delle ROS prevenendo soprattutto il danno da perossidazione lipidica. Un deficit di vitamina E è associato ad anomalie neuromuscolari, come atassia e miopatie, dovute principalmente alla mancanza dell'azione di *scavenging* della vitamina. La carenza di vitamina E può anche determinare stati di anemia, legati all'aumentata suscettibilità degli eritrociti alla perossidazione lipidica [172].

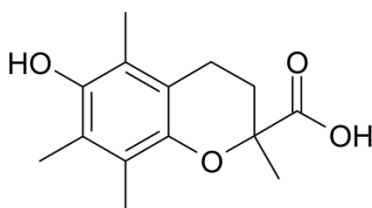


Figura 19. Struttura chimica del trolox.

È stato dimostrato che alti livelli plasmatici di vitamina E sono associati a una riduzione del rischio di sviluppare l'AD sporadico, dimostrando per questa vitamina anche un ruolo neuroprotettivo [173].

Il trolox conserva l'anello cromanolico della vitamina E, mantenendo così la capacità antiossidante, ma presenta un gruppo carbossilico che ne aumenta la solubilità nel mezzo acquoso, rendendo il composto particolarmente utile per la sperimentazione su modelli cellulari *in vitro*.

Scopo della tesi

Le alterazioni della funzionalità mitocondriale detengono un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia di Alzheimer. Tali alterazioni sostengono il processo neurodegenerativo attraverso numerosi meccanismi, quali la riduzione della disponibilità energetica, la produzione di una eccessiva quantità di specie radicaliche, l'induzione della morte cellulare mediante modalità apoptotiche. Le alterazioni mitocondriali sono state inoltre riscontrate nelle fasi iniziali della patologia [179].

Il laboratorio presso il quale ho condotto il dottorato si è precedentemente occupato del coinvolgimento della funzionalità mitocondriale nell'AD. Nel 2002 Bosetti e collaboratori dimostrarono che l'attività enzimatica della citocromo c ossidasi (COX) risultava ridotta del 30-35% rispetto ai controlli, senza interferire con la velocità di sintesi di ATP mitocondriale, che rimaneva invece invariata nei neuroni di pazienti AD rispetto ai controlli [84]. Questo risultato apparentemente controverso fu discusso sulla base dei coefficienti di controllo. Dal momento che l'attività della COX sembra avere un controllo molto basso sulla fosforilazione ossidativa [180], una sua considerevole riduzione di attività potrebbe non essere sufficiente a determinare un calo della OXPHOS in condizioni normossiche. Tuttavia, l'attività COX potrebbe diventare determinante in presenza di una ridotta disponibilità di ossigeno (ipossia neuronale) [182], una condizione che si verifica effettivamente nel cervello di pazienti AD nei quali è stata documentata la riduzione del flusso ematico cerebrale [141].

Come descritto nell'introduzione, la principale sede di accumulo intracellulare del peptide β -amiloide (A β) è rappresentata dal mitocondrio [73], a livello del quale la A β determina una serie di profonde alterazioni funzionali [80]. In particolare, nei pazienti AD l'attività COX risulta profondamente compromessa e l'enzima sembra inoltre essere direttamente inibito dal peptide A β [83].

Sulla base di queste evidenze è nata l'idea di verificare se l'ipossia e il peptide A β potessero agire in maniera sinergica nel determinare un'alterazione della funzionalità mitocondriale, promuovendo così il processo neurodegenerativo.

Nella prima parte dello studio abbiamo utilizzato come modello sperimentale cellule PC12 (feocromocitoma di ratto) esposte contemporaneamente al peptide A β_{1-42} e all'ipossia (pO₂ 1.5%) per 24h e abbiamo valutato, come parametri funzionali, l'attività COX, la fosforilazione ossidativa, il contenuto intracellulare di ATP e la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Una fase della prima parte della sperimentazione è stata dedicata anche allo studio di molecole dotate di attività antiossidante e protettiva, analizzando in particolare la loro capacità di contrastare la condizione di stress ossidativo indotta dall'ipossia o dall'esposizione congiunta all'ipossia e al peptide A β .

I risultati ottenuti nella prima fase dello studio hanno messo in evidenza il potenziale effetto additivo dell'ipossia e del peptide A β . Questi due fattori contribuiscono congiuntamente alla riduzione della disponibilità energetica e all'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, fenomeni che potrebbero sostenere il processo di morte cellulare che caratterizza la malattia di Alzheimer.

Per consolidare i risultati ottenuti nella prima parte della sperimentazione, abbiamo proseguito il nostro studio introducendo un nuovo modello sperimentale rappresentato da fibroblasti prelevati da pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer. I fibroblasti inclusi nello studio sono caratterizzati dalla presenza di mutazioni a carico dei geni codificanti per la proteina APP e per la presenilina, le quali hanno come effetto finale l'aumento della produzione del peptide A β [23]. Nella seconda parte dello studio, siamo passati dunque da un modello sperimentale in cui il peptide A β veniva supplementato dall'esterno a un modello caratterizzato dalla iperproduzione endogena del peptide neurotossico.

Lo scopo della seconda parte della sperimentazione è stato quello di studiare gli effetti di una esposizione prolungata all'ipossia di fibroblasti AD, analizzando in particolare i meccanismi attraverso i quali le alterazioni della funzionalità mitocondriale potrebbero contribuire alla patogenesi della AD. Pertanto, dopo aver coltivato i fibroblasti AD per 72h in ipossia (pO₂ 1%), ne abbiamo valutato la massa mitocondriale, il contenuto intracellulare di ATP, il consumo di glucosio e la produzione di lattato, il potenziale della membrana mitocondriale interna e il contenuto di specie reattive dell'ossigeno. I risultati finora ottenuti sui fibroblasti AD suggeriscono che la presenza di mutazioni determinanti un aumento della

produzione del peptide A β sia associata un danno bioenergetico e ossidativo e che uno dei meccanismi attraverso cui l'ipossia esplica la sua azione di danno nella AD, possa essere causato dal potenziamento delle già presenti alterazioni della funzionalità mitocondriale.

Capitolo 2

Materiali e metodi

1. Colture cellulari e trattamenti

1.1. Cellule PC12 (rat pheochromocytoma)

La linea cellulare PC12 (ATCC number CRL-1721.1) è stata coltivata in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenente glucosio 25 mM, glutammina 4 mM, piruvato 1 mM, penicillina 100 U/ml, streptomina 100 µg/ml, amfotericina B 0.25 µg/ml e arricchito con siero bovino fetale (FBS) al 7.5% e siero di cavallo (HS) al 7.5%. I sieri aggiunti al mezzo di coltura sono stati precedentemente sottoposti a una procedura di inattivazione termica (56°C per 30 minuti) per eliminare le proteine del complemento che potrebbero generare una risposta immunitaria a carico delle cellule in coltura. Le colture cellulari sono state condotte a 37°C, in atmosfera umidificata e in presenza pCO₂ 5%. Durante la sperimentazione le cellule PC12 sono state coltivate per 24 h per favorirne l'adesione alla piastra; il terreno di coltura è stato poi sostituito con un mezzo fresco contenente o meno il peptide beta-amiloide₁₋₄₂ (Aβ) (rPEPTIDE, Bogart, GEO, USA). Per le successive 24 h le cellule PC12 sono state incubate in normossia (pO₂ 21%) o ipossia (pO₂ 0.5-1%), e poi trattate secondo le diverse modalità previste dal metodo di dosaggio eseguito. Le incubazioni in condizioni ipossiche sono state condotte mediante l'uso di una cappa Invivo₂ 200 (Ruskin Technology Ltd., UK), collegata ad un gas-mixer che consente di controllare il valore della

pressione parziale di ossigeno. Le cellule PC12 sono state seminate in modo da ottenere al momento dell'esperimento una confluenza pari a circa 95%.

Per valutare l'effetto del trattamento delle PC12 con molecole ad azione protettiva, le cellule sono state seminate nel mezzo di coltura completo arricchito con ciascun composto analizzato (idebenone, acido oleico, spermina e trolox) per favorirne l'accumulo intracellulare; dopo 24 h, il terreno è stato sostituito con mezzo fresco contenente la stessa concentrazione del composto in esame. Tutti i composti chimici utilizzati nelle formulazioni dei mezzi di coltura sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

1.2. Fibroblasti da pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer

Le linee di fibroblasti primari su cui abbiamo condotto la nostra sperimentazione sono state isolate da pazienti in cura presso il dipartimento di neurobiologia del Karolinska Institutet (Stockholm). I fibroblasti, derivanti da biopsie della cute, sono stati coltivati in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenente glucosio 25 mM, glutammina 4 mM, piruvato 1 mM, penicillina 100 U/ml, streptomina 100 µg/ml, amfotericina B 0.25 µg/ml e arricchito con siero bovino fetale (FBS) al 15%. Le colture cellulari sono state condotte a 37°C, in atmosfera umidificata e in presenza pCO₂ 5%. Durante la sperimentazione i fibroblasti sono stati seminati nel mezzo di coltura appena descritto contenente glucosio 25 mM per favorire l'adesione delle cellule alla piastra; dopo 12 h, il terreno di coltura è stato sostituito con un mezzo fresco contenente glucosio 5 mM. Per le successive 72 h i fibroblasti sono stati incubati in normossia (pO₂ 21%) o ipossia (pO₂ 1%), e poi trattati secondo le diverse modalità previste dal metodo di dosaggio eseguito. Le incubazioni in condizioni ipossiche sono state condotte mediante l'uso di una cappa Invivo₂ 200.

I fibroblasti sono stati seminati in modo da ottenere al momento dell'esperimento una confluenza delle cellule pari a circa 95%. A tale scopo sono state scelte densità di semina differenti, dipendenti principalmente dal tempo di duplicazione di ciascuna linea cellulare nelle diverse condizioni di incubazione. Tutti gli esperimenti sono stati condotti su fibroblasti al 15°-16° passaggio. Tutti i composti chimici utilizzati nelle formulazioni dei mezzi di coltura sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

2. Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata usando il metodo di Lowry [174]. Il campione viene trattato con 5% Na deossicolato e successivamente incubato per 10 minuti in presenza di una miscela di reazione costituita da 2% Na₂CO₃ e 0.1M NaOH (reattivo 1), 2% Na-K tartrato (reattivo 2) e 1% CuSO₄ (reattivo 3) nel rapporto stechiometrico 100:1:1. Alla miscela viene poi aggiunto il reattivo di Folin-Ciocalteau's ad una concentrazione finale del 3%. Dopo 30min l'assorbanza del campione viene letta a 750nm. La concentrazione proteica del campione viene determinata sulla base di una curva standard costruita utilizzando quantità crescenti di albumina di siero bovino (BSA) che alla concentrazione di 1 mg/ml mostra un'assorbanza di 0.64 unità alla lunghezza d'onda di 278 nm.

3. Attività enzimatiche

3.1. Attività dell'enzima citrato sintasi (CS)

L'attività dell'enzima citrato sintasi, considerata un indice della massa mitocondriale, è stata misurata incubando le cellule in Triton-X100 0.02% e seguendo spettrofotometricamente la riduzione dell'acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) [175] in una reazione accoppiata con acetil-CoA e ossalacetato. La reazione catalizzata dalla citrato sintasi produce CoA-SH, il quale reagisce con il DTNB rompendone il ponte disolfuro e producendo lo ione 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB). Questa reazione è stechiometrica, poiché una mole di CoA-SH produce una mole di NTB. La concentrazione di NTB è misurata spettrofotometricamente a 412nm ($\epsilon=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La reazione è condotta a 30°C in tampone Tris-HCl 125mM a pH 8. Dopo la determinazione della concentrazione proteica l'attività è stata espressa come nmol/min/mg di proteina.

3.2. Attività dell'enzima citocromo c ossidasi (COX)

L'attività COX è stata determinata seguendo spettrofotometricamente l'ossidazione del Cit.C_{red} a 550-540nm ($\Delta\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Il dosaggio enzimatico viene condotto a 30°C, in

tampone KH_2PO_4 25mM pH 7.6 e in presenza di Cit.C_{red} 40 μM , rotenone 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e antimicina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dopo la determinazione della concentrazione proteica, l'attività è stata espressa come nmol/min/mg di proteina. Poiché le cellule potrebbero avere un contenuto variabile di mitocondri, le attività COX sono state normalizzate sull'attività della citrato sintasi.

3.3. Attività dell'enzima catalasi (CAT)

L'attività CAT è stata determinata spettrofotometricamente seguendo la degradazione di H_2O_2 a 240nm ($\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Il dosaggio enzimatico viene condotto a 25°C, in tampone KH_2PO_4 50mM pH 7.4 e in presenza di H_2O_2 30 mM. Dopo la determinazione della concentrazione proteica, l'attività è stata espressa come $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ di proteina [176].

3.4. Attività dell'enzima glutazione perossidasi (GPx)

L'attività GPx è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'ossidazione del NADPH a 340nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Il dosaggio enzimatico viene condotto a 30°C, in tampone tris-HCl 100mM + EDTA 5mM pH 7.6 e in presenza di NaN_3 1 mM, GSH 3 mM, NADPH 0.1 mM, H_2O_2 50 μM , glutazione riduttasi 0.6U. Dopo la determinazione della concentrazione proteica, l'attività è stata espressa come nmol/min/mg di proteina.

4. Determinazione del contenuto intracellulare di glutazione

La concentrazione del glutazione ridotto (GSH) e ossidato (GSSG) è stata determinata seguendo il metodo enzimatico di Vergani et al [177]. Le cellule in adesione sono incubate in acido 5-sulfosalicilico al 5% per 10 minuti per estrarre il glutazione totale contenuto a livello intracellulare (estratto acido). Dopo aver recuperato l'estratto acido, le cellule vengono raccolte utilizzando KOH 0.5 M e successivamente usate per determinare la quantità di proteina presente nel campione. Il dosaggio della concentrazione del GSH totale viene condotto sull'estratto acido; mentre la determinazione della concentrazione del GSSG si ottiene derivatizzando l'estratto acido mediante l'aggiunta allo stesso di trietanolamina e 2-vinilpiridina. Il dosaggio viene condotto a 25°C, in tampone KH_2PO_4 100mM + EDTA 5mM

pH 7.4 e in presenza di DTNB 0.5 mM, NADPH 0.1 mM, glutatione riduttasi 2U. La velocità di formazione dell'acido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB), risultante dalla reazione del DTNB con il GSH, viene misurata spettrofotometricamente a 412nm ($\epsilon=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). In questa reazione il GSH è ossidato a GSSG, che è poi riconvertito a GSH in presenza di glutatione riduttasi e NADPH. Il contenuto totale di glutatione e GSSG viene determinato utilizzando una curva di calibrazione ottenuta da quantità note di glutatione e GSSG. La quantità di GSH viene determinata come differenza tra il glutatione totale e il GSSG. Dopo la determinazione della concentrazione proteica la concentrazione di GSH e GSSG è stata espressa come nmol/mg di proteina.

5. Metodi luminometrici

5.1. Determinazione della velocità di sintesi dell'ATP

La velocità di sintesi dell'ATP mitocondriale è stata misurata utilizzando il metodo riportato da Sgarbi et al [178]. Le cellule sono lavate in PBS e poi risospese in un tampone contenente Tris 10mM, KCl 100mM, KH_2PO_4 5mM, EGTA 1mM, EDTA 3mM, MgCl_2 2mM (pH 7.4). Le cellule vengono incubate in presenza di digitonina 60 $\mu\text{g/ml}$ (per permeabilizzare la membrana plasmatica), iodoacetamide 2mM (per inibire la sintesi di ATP per via glicolitica) e diadenosina pentafosfato 1.25 mM (inibitore delle miochinasi). La reazione viene fatta partire aggiungendo glutammato/malato 10 mM e ADP 0.5 mM al campione. Dopo 3 minuti la reazione viene bloccata aggiungendo dimetilsolfossido (DMSO). La quantità di ATP prodotto viene determinata per mezzo del metodo bioluminescente luciferina-luciferasi, in cui la luciferina è convertita a ossiluciferina a spese dell'ATP con concomitante emissione di luce (ATP bioluminescent assay kit CLS II; Roche; Basel, Svizzera). La velocità di sintesi dell'ATP viene misurata utilizzando come riferimento l'intensità della luce emessa da uno standard interno costituito da una quantità nota di ATP (33 pmol). Dopo la determinazione della concentrazione proteica, la velocità di sintesi dell'ATP è stata espressa come nmol/min/mg di proteina.

5.2. Determinazione del contenuto intracellulare di ATP

Le cellule sono lavate in PBS, risospese in un tampone contenente Tris 10mM, KCl 100mM, KH_2PO_4 5mM, EGTA 1mM, EDTA 3mM, MgCl_2 2mM (pH 7.4) e successivamente lisate in DMSO per liberare l'ATP contenuto a livello intracellulare. La quantità di ATP viene determinata per mezzo del metodo bioluminescente luciferina-luciferasi (ATP bioluminescent assay kit CLS II; Roche; Basel, Svizzera), utilizzando come riferimento l'intensità della luce emessa da uno standard interno costituito da una quantità nota di ATP (33 pmol). Dopo la determinazione della concentrazione proteica il contenuto intracellulare di ATP è stato espresso come nmol/mg di proteina.

6. Determinazione del consumo di glucosio e della produzione di lattato

Le quantità di glucosio consumato e di lattato prodotto vengono determinate mediante metodo colorimetrico, valutando l'assorbanza del campione associata alla formazione di un cromoforo a 510nm e 546nm rispettivamente e utilizzando come riferimento uno standard interno costituito da quantità note di glucosio o lattato (Glucose liquid; FAR diagnostic; Verona, Italia – Lactate PAP fluid; Centronic GmbH; Wartenberg, Germany). Le determinazioni colorimetriche sono condotte sul mezzo di coltura dopo il trattamento delle cellule. Dopo la determinazione della concentrazione proteica, le quantità di glucosio consumato e di lattato prodotto sono state espresse come $\mu\text{mol/mg}$ di proteina.

7. Misura del contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Il contenuto intracellulare di ROS è stato misurato mediante l'uso della sonda 2',7'diclorodidrossifluoresceina diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) (Molecular Probes). La $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ diffonde passivamente attraverso la membrana plasmatica e, una volta giunta nel citosol, viene privata dei gruppi acetato dalle esterasi intracellulari dando la molecola diclorodidrossifluoresceina (H_2DCF). La H_2DCF viene ossidata durante la reazione con i ROS

intracellulari convertendosi nella molecola fluorescente diclorofluoresceina (DCF) ($\lambda_{ex}=485nm$; $\lambda_{em}=535nm$).

7.1. Misura delle ROS nelle cellule PC12

Le cellule sono lavate in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) e incubate con $5\mu M$ H₂DCF-DA in HBSS arricchito con Ca²⁺ e Mg²⁺ in assenza di FBS per 30 minuti al buio. Dopo l'incubazione le cellule sono raccolte e il contenuto intracellulare di ROS viene analizzato misurando l'emissione di fluorescenza a 535nm in un Wallac Victor2 1420 multilabel counter. Dopo la determinazione della concentrazione proteica, le unità di fluorescenza emessa (UF) sono normalizzate per il contenuto proteico ed espresse come UF/ μg di proteina.

7.2. Misura delle ROS nei fibroblasti AD

Le cellule sono lavate in DMEM e incubate con $25\mu M$ H₂DCF-DA in terreno completo senza FBS per 45 minuti al buio. Dopo l'incubazione, il mezzo di incubazione viene rimosso e sostituito con HBSS. Il contenuto intracellulare di ROS viene analizzato misurando sulle cellule in adesione l'emissione di fluorescenza a 535nm in un Wallac Victor2 1420 multilabel counter.

8. Misura del potenziale della membrana mitocondriale interna

Il potenziale delle membrana mitocondriale interna è stato valutato mediante l'uso della sonda fluorescente tetrametilrodamina metil-estere (TMRM). La TMRM è una sonda cationica ($\lambda_{ex}=550nm$; $\lambda_{em}=580nm$) che viene rapidamente sequestrata all'interno dei mitocondri per effetto del potenziale di membrana.

Per valutare il potenziale di membrana, le cellule sono state lavate con DMEM e incubate in presenza di TMRM (Molecular Probes) 20nM per 30 minuti al buio. Dopo l'incubazione, i fibroblasti sono stati lavati con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) e successivamente raccolti mediante l'uso di tripsina. Il potenziale di membrana è stato valutato misurando l'intensità di fluorescenza emessa dalla TMRM a 580nm mediante un'analisi citofluorimetrica.

9. Microscopia in fluorescenza

Il network mitocondriale è stato valutato incubando le cellule in presenza di TMRM 0.1 μ M per 10 minuti a pO₂ 21% e pO₂ 1%. Le immagini sono state ottenute con un microscopio a fluorescenza (Olympus IX50) dotato di CCD camera e acquisite mediante l'uso del software IAS2000 (Delta Sistemi).

10. Analisi dei dati

Tutti gli esperimenti sono stati condotti almeno in duplicato. Per tutte le misurazioni in risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD). L'analisi statistica è stata eseguita applicando il test T di student. Sono state considerate statisticamente significative differenze con $p \leq 0.05$ (*) e $p \leq 0.01$ (**).

Capitolo 3

Risultati

Parte I – Linea cellulare PC12

1. Caratterizzazione del modello cellulare in ipossia

L'obiettivo della prima parte del progetto di ricerca è stato quello di analizzare gli effetti dell'azione congiunta dell'ipossia e del peptide β -amiloide₁₋₄₂ (A β) sulla linea cellulare PC12. Prima di procedere con lo studio degli effetti del trattamento con A β , abbiamo ritenuto opportuno identificare innanzitutto la pO₂ da utilizzare durante gli esperimenti e successivamente caratterizzare la risposta del nostro modello cellulare alla sola ipossia.

1.1. Scelta della pressione parziale di ossigeno (pO₂)

Per identificare la pO₂ a cui condurre i nostri esperimenti abbiamo scelto l'attività della COX come parametro di riferimento. A tale scopo le cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO₂ pari a 1.5 e 0.5%, considerate rispettivamente condizioni di ipossia moderata e spinta. L'attività della COX è fortemente sensibile alla concentrazione di O₂, essendo l'ossigeno un substrato dell'enzima. Abbiamo osservato una riduzione dell'attività enzimatica pari al 46 (p<0.01) e al 70% (p<0.01), indotta rispettivamente dall'esposizione a pO₂ 1.5 e 0.5% (figura 1a). Poiché la COX è un enzima mitocondriale, l'attività misurata

durante gli esperimenti potrebbe essere influenzata anche dalla quantità di mitocondri presenti all'interno della cellula. Pertanto, è necessario normalizzare l'attività enzimatica della COX per l'attività enzimatica dell'enzima citrato sintasi (CS), considerata un indice della massa mitocondriale. In seguito all'incubazione delle cellule in condizioni ipossiche l'attività CS subisce una lieve riduzione (-7% a pO₂ 1.5%, p<0.05; -7% a pO₂ 0.5%, p<0.05), che sembra essere indipendente dalla concentrazione dell'ossigeno (figura 1b).

Come risulta evidente osservando il grafico, la riduzione dell'attività COX indotta dall'ipossia viene confermata anche dopo la normalizzazione per il contenuto di mitocondri (-48% a pO₂ 1.5%, p<0.01; -69% a pO₂ 0.5%, p<0.01) (figura 1c).

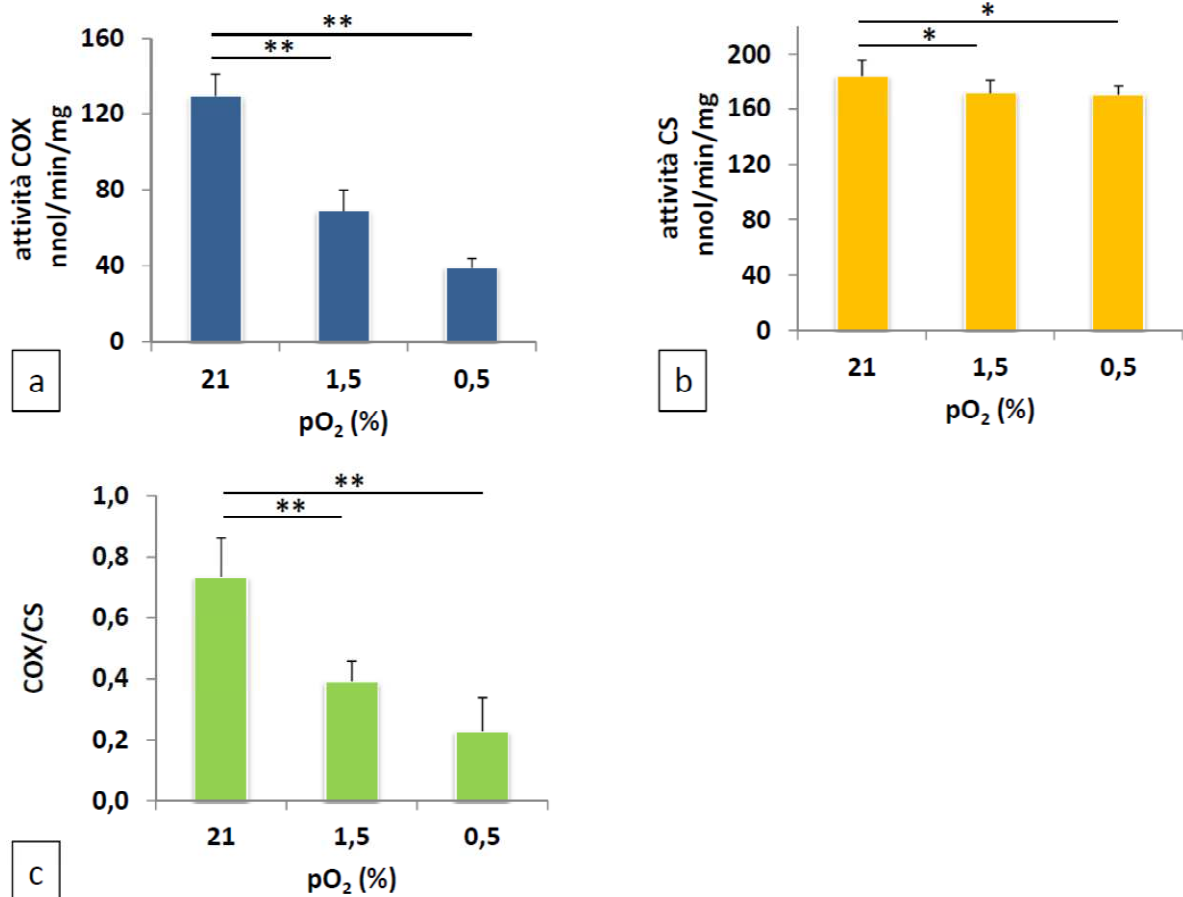


Figura 1. Dipendenza dell'attività citocromo c ossidasi (COX) dalla pO₂. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di differenti pressioni parziali di ossigeno. L'attività enzimatica è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'ossidazione del citocromo c ridotto (Cit.C_{red}) ed espressa come numero di moli di Cit.C_{red} ossidate nell'unità di tempo per mg di proteina (a). L'attività COX è stata normalizzata (c) sull'attività della citrato sintasi (CS) (b). Gli istogrammi mostrano il valore medio ± deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. ** (p<0.01) e * (p<0.05) indicano la significatività statistica dei dati.

1.2. Velocità di sintesi dell'ATP mitocondriale

Sebbene sia stato dimostrato che la COX esercita un controllo moderato sulla fosforilazione ossidativa (OXPHOS), la compromissione della sua attività indotta dall'ipossia potrebbe comunque influenzare il processo di sintesi mitocondriale dell'ATP. Pertanto, abbiamo deciso di proseguire la sperimentazione misurando la velocità della sintesi di ATP NADH-dipendente.

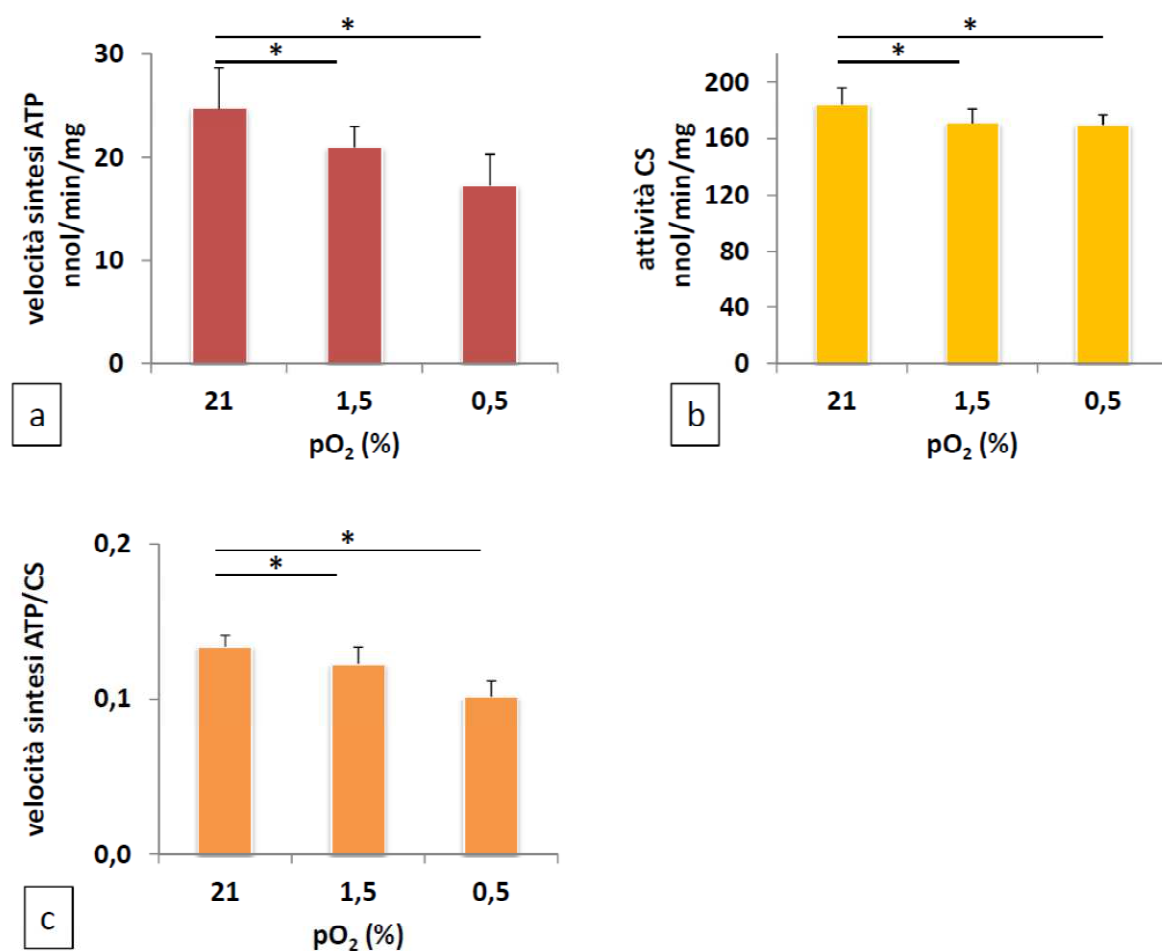


Figura 2. Dipendenza della velocità di sintesi dell'ATP mitocondriale dalla pO₂. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di differenti pressioni parziali di ossigeno. La velocità di sintesi dell'ATP NADH-dipendente è stata valutata in cellule permeabilizzate con digitonina ed energizzate con glutammato/malato in presenza di ADP. La velocità di sintesi è stata espressa come numero di moli di ATP prodotte nell'unità di tempo per mg di proteina (a). La velocità di sintesi è stata normalizzata (c) sull'attività della citrato sintasi (CS) (b). Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. *(p < 0.05) indica la significatività statistica dei dati.

Abbiamo osservato una riduzione della velocità di sintesi dell'ATP del 15 ($p < 0.05$) e del 30% ($p < 0.05$) rispettivamente nelle condizioni di pO_2 1.5 e 0.5% (figura 2a). Poiché il processo di OXPHOS è localizzato a livello mitocondriale, va anche esso normalizzato per il contenuto di mitocondri della cellula. Avendo riscontrato una lieve riduzione della CS in ipossia (figura 2b), dopo la normalizzazione le velocità OXPHOS nei campioni ipossici riportano una riduzione del 10% a pO_2 1.5% ($p < 0.05$) e del 24% a pO_2 0.5% ($p < 0.05$) rispetto al controllo in normossia (figura 2c).

1.3. Contenuto intracellulare di ATP

Avendo osservato in ipossia una riduzione della velocità della fosforilazione ossidativa, abbiamo deciso di misurare anche i livelli intracellulari di ATP, il cui contenuto può essere considerato un indice dello stato energetico della cellula. Coerentemente con il calo della OXPHOS, il contenuto intracellulare di ATP risulta considerevolmente ridotto in ipossia, riportando un decremento del 22% a pO_2 1.5% ($p < 0.01$) e del 27% a pO_2 0.5% (n.s.) rispetto al controllo (figura 3).

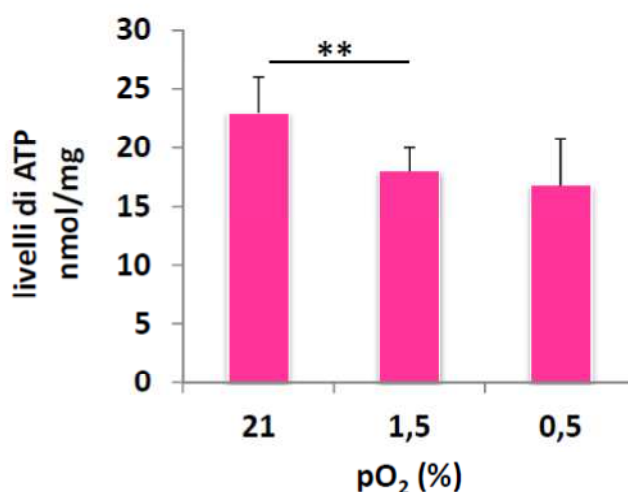


Figura 3. Dipendenza del contenuto intracellulare di ATP dalla pO_2 . Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di differenti pressioni parziali di ossigeno. Il contenuto di ATP è stato misurato mediante metodo luminometrico ed espresso come numero di moli di ATP per mg di proteina. L'istogramma mostra il valore medio \pm deviazione standard tre esperimenti indipendenti. **($p < 0.01$) indica la significatività statistica dei dati.

1.4. Contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Considerata la significativa riduzione dell'attività COX e della disponibilità di ATP dovuta alla esposizione a pO_2 0.5%, abbiamo scelto di condurre la sperimentazione successiva adottando come condizione di ipossia una pO_2 1.5%.

L'alterazione della OXPHOS in ipossia potrebbe essere correlata a un aumento della produzione di radicali liberi; abbiamo pertanto deciso di misurare i livelli intracellulari di ROS, utilizzando la sonda $H_2DCF-DA$. Come mostrato nel grafico, dopo 24 h nelle cellule esposte all'ipossia il contenuto di ROS subisce un significativo aumento (+33% a pO_2 1.5%, $p < 0.01$) rispetto alle cellule controllo coltivate in normossia (figura 4).

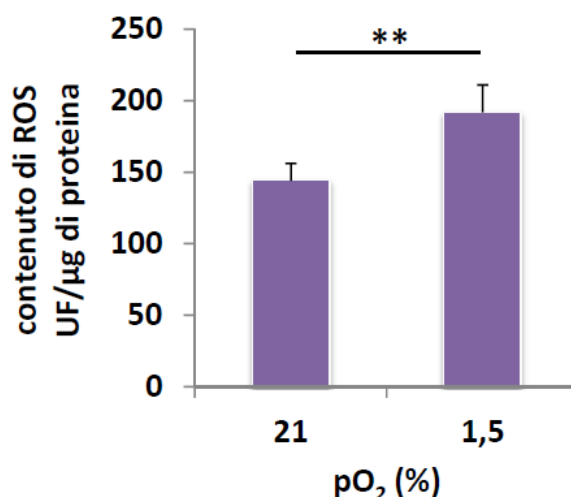


Figura 4. Contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO_2 21% e pO_2 1.5%. La quantità di ROS presenti nei campioni è stata valutata misurando la fluorescenza emessa dalla sonda $H_2DCF-DA$. Il contenuto intracellulare di ROS è stato espresso come unità di fluorescenza (UF) emessa per μ g di proteina. L'istogramma mostra il valore medio \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. ******($p < 0.01$) indica la significatività statistica dei dati.

1.5. Antiossidanti endogeni

L'aumento dei livelli intracellulari di ROS è generalmente associato alla presenza di una condizione di stress ossidativo. Tale condizione è in grado di indurre l'attivazione dei sistemi antiossidanti endogeni, che hanno il ruolo di proteggere la cellula dai danni generati dall'interazione dei ROS con le macromolecole biologiche. Per verificare se nelle nostre

condizioni sperimentali le cellule sono caratterizzate da un'alterazione dello stato redox, abbiamo deciso di misurare l'attività dei principali sistemi di protezione endogeni.

1.5.1. Antiossidanti enzimatici

La catalasi e la glutazione perossidasi sono enzimi appartenenti alla classe delle ossidoreduttasi coinvolti nelle reazioni di detossificazione del perossido di idrogeno. Nelle PC12 esposte all'ipossia abbiamo rilevato un aumento significativo dell'attività della catalasi (+40% a pO_2 1.5%, $p < 0.05$), indicativo di uno stato redox alterato (figura 5a). Abbiamo poi misurato l'attività dell'enzima glutazione perossidasi, che risulta però invariata nelle nostre condizioni sperimentali (figura 5b).

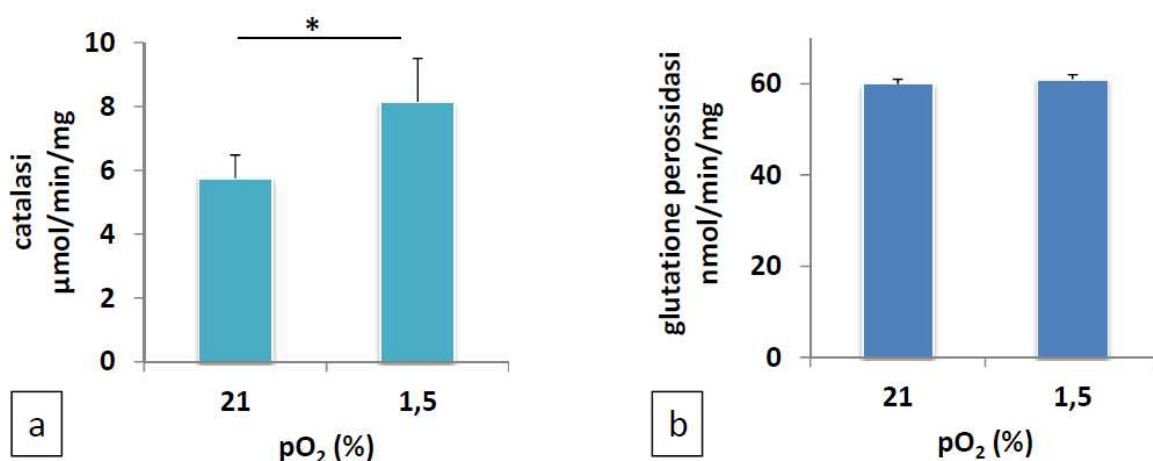


Figura 5. Attività degli enzimi antiossidanti catalasi e glutazione perossidasi. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO_2 21% e pO_2 1.5%. L'attività enzimatica della catalasi è stata determinata spettrofotometricamente seguendo la degradazione del perossido di idrogeno a 240 nm ed espressa come numero di moli di H_2O_2 degradate nell'unità di tempo per mg di proteina (a). L'attività enzimatica della glutazione perossidasi è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'ossidazione del NADPH a 340 nm ed espressa come numero di moli di NADPH ossidate nell'unità di tempo per mg di proteina (b). Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. *($p < 0.05$) indica la significatività statistica dei dati.

1.5.2. Livelli intracellulari di glutazione

Il glutazione è uno dei sistemi antiossidanti più efficienti. La valutazione del contenuto di glutazione totale e della sua forma ossidata fornisce informazioni sullo stato redox della

cellula. Nelle PC12 esposte ad ipossia per 24 h abbiamo osservato un significativo aumento sia dei livelli di glutazione totale (+100% a pO₂ 1.5%, p<0.01) (figura 6a) che di glutazione ossidato (+94% a pO₂ 1.5%, p<0.05) (figura 6b). La differenza tra il GSH totale e il GSSG fornisce il contenuto di glutazione ridotto, che risulta incrementato di quasi il doppio in ipossia rispetto al suo contenuto in normossia. Anche quest'ultimo risultato suggerisce l'induzione di una condizione di possibile stress ossidativo mediata dall'ipossia.

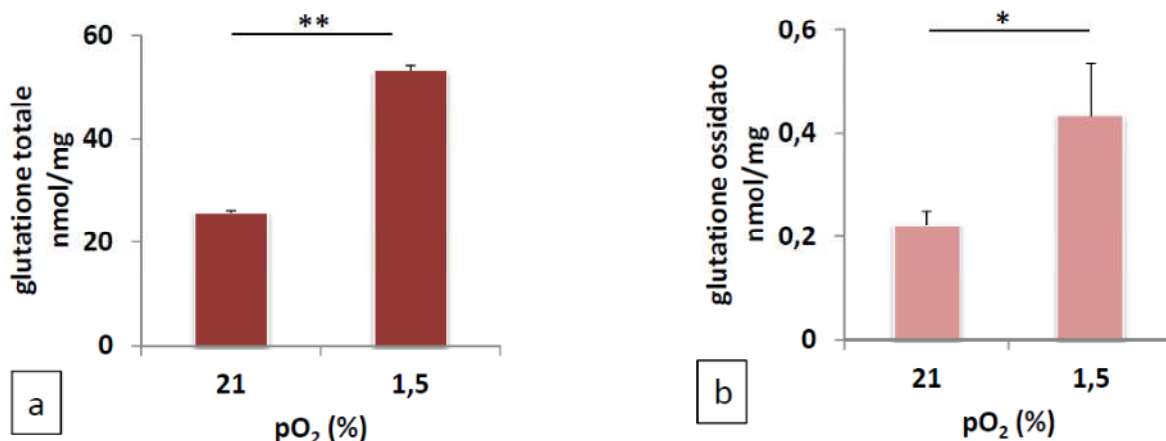


Figura 6. Contenuto intracellulare di glutazione totale (GSH) (a) e ossidato (GSSG) (b). Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO₂ 21% e pO₂ 1.5%. La quantità di glutazione presente nei campioni è stata determinata spettrofotometricamente seguendo la velocità di formazione dell'acido 2-nitro-5-tiobenzoico a 412 nm. Il contenuto di glutazione del campione è stato determinato utilizzando una curva di calibrazione ottenuta da quantità note di GSH e GSSG ed espresso come nmol di GSH e GSSG per mg di proteina. Gli istogrammi mostrano il valore medio ± deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. ** (p<0.01) e * (p<0.05) indicano la significatività statistica dei dati.

2. Effetti di molecole ad azione protettiva e antiossidante su cellule PC12 esposte all'ipossia

Dopo aver analizzato il comportamento del modello cellulare in risposta alla riduzione della disponibilità di ossigeno, abbiamo proseguito il nostro studio con la valutazione degli effetti del trattamento con molecole dotate di proprietà antiossidanti e stabilizzanti della membrana mitocondriale. Abbiamo inserito nello studio le seguenti molecole: idebenone, oleato, spermina e trolox. Per ciascuna di esse abbiamo condotto una valutazione preliminare per identificare la concentrazione da utilizzare durante gli esperimenti.

A tale scopo abbiamo incubato le cellule PC12 per 24 h a pO₂ 21% in presenza di concentrazioni crescenti della molecola di interesse, identificando così la massima concentrazione utilizzabile prima di incorrere in fenomeni di tossicità. Una volta identificato l'intervallo di concentrazione utile per ciascuna sostanza in esame, abbiamo misurato i livelli intracellulari di ROS nelle cellule coltivate in presenza delle molecole protettive. Nella figura 7 sono riportati i risultati ottenuti in questa fase di settaggio.

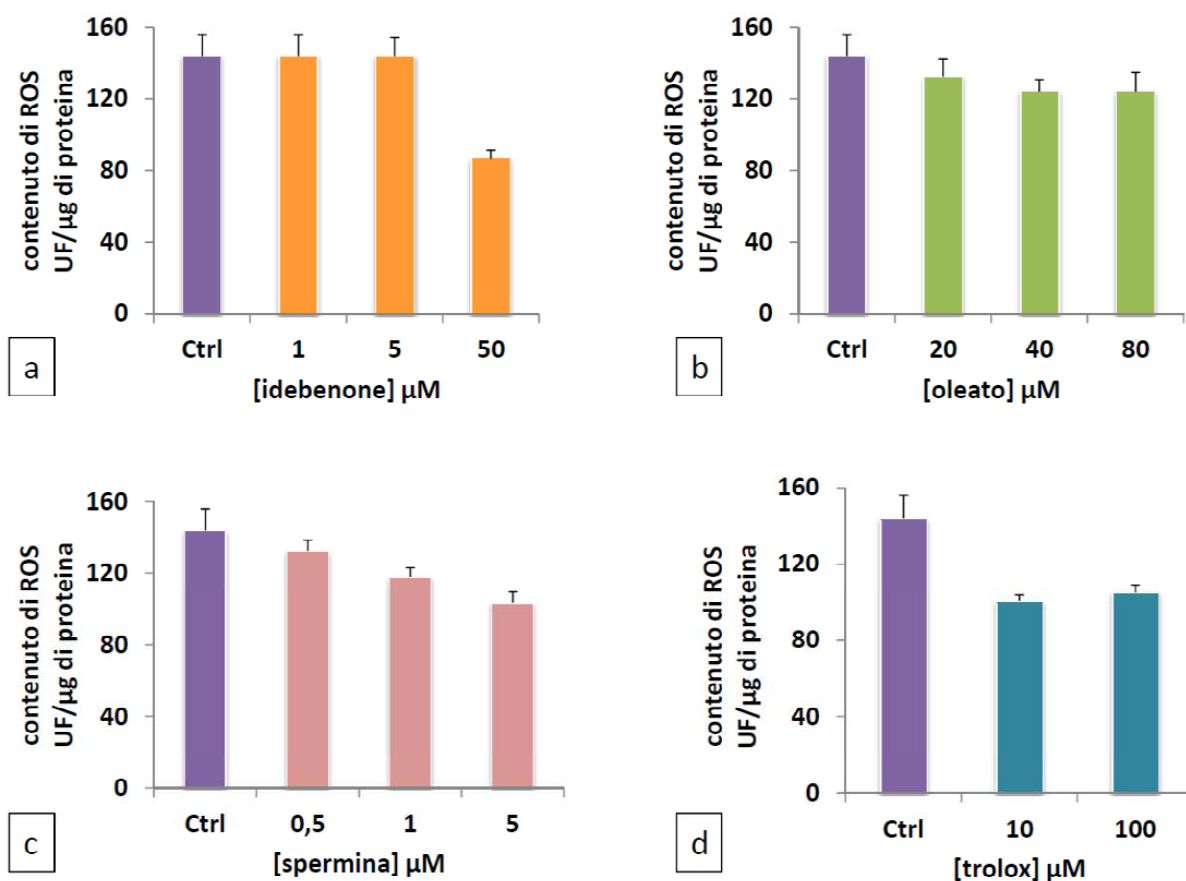


Figura 7. Dipendenza dalla concentrazione della capacità antiossidante di idebenone, oleato, spermina e trolox. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO₂ 21% e concentrazioni crescenti di molecole ad azione protettiva. Il potere antiossidante di ciascuna molecola è stato valutato misurando la capacità di ridurre il contenuto basale di ROS in normossia. La quantità di ROS presenti nei campioni è stata valutata misurando la fluorescenza emessa dalla sonda H₂DCF-DA. Il contenuto intracellulare di ROS è stato espresso come unità di fluorescenza (UF) emessa per μg di proteina. L'istogramma mostra il valore medio ± deviazione standard due esperimenti indipendenti.

L'idebenone non mostra alcun effetto antiossidante a basse concentrazioni; abbiamo pertanto deciso di adottare negli esperimenti la massima concentrazione utilizzabile per questa sostanza (idebenone 50μM) (figura 7a). Analizzando invece le proprietà dell'oleato, è possibile osservare che questa molecola mostra un effetto protettivo di pari entità sia a 40

che a 80 μM . In questo caso abbiamo scelto tra le due concentrazioni più efficaci quella più bassa (oleato 40 μM) (figura 7b). Per la spermina e il trolox abbiamo invece stabilito di impiegare negli esperimenti la più alta concentrazione utilizzabile, nel tentativo di massimizzare l'effetto protettivo a carico di queste due sostanze (spermina 5 μM e trolox 100 μM) (figure 7c e 7d).

2.1. Effetto di molecole a potenziale azione protettiva sulla generazione di ROS

Dopo aver individuato le concentrazioni attive per ciascuna molecola in esame, abbiamo valutato la capacità di ciascuna di esse di contrastare l'incremento dei ROS indotto dall'esposizione delle cellule all'ipossia. Come descritto nel capitolo *materiali e metodi* (paragrafo 1.1), le cellule sono state pre-incubate con la sostanza in esame e successivamente esposte all'ipossia sempre in presenza della suddetta sostanza. Dopo 24 h in incubazione in ipossia abbiamo misurato i livelli di ROS intracellulari. L'idebenone sembra essere la più efficace delle sostanze analizzate (figura 8). Questa molecola riduce infatti il contenuto di ROS delle cellule esposte all'ipossia (-42%, $p < 0.05$), riportandolo a un valore paragonabile a quello delle cellule controllo coltivate in normossia. Oleato, spermina e trolox mostrano invece un effetto protettivo più modesto, producendo un calo dei livelli di ROS in ipossia del 14 (n.s.), 28 ($p < 0.05$) e 20% (n.s.) rispettivamente (figura 8).

2.2. Effetto di molecole a potenziale azione protettiva sull'attività COX e i livelli di ATP

Avendo riscontrato per le sostanze analizzate un effetto di protezione nei confronti dell'incremento dei ROS indotto dall'ipossia, abbiamo ritenuto opportuno valutare l'eventuale capacità di queste molecole di contrastare anche il danno bioenergetico associato alla riduzione della disponibilità di ossigeno. Abbiamo così valutato sia l'attività della COX che i livelli di ATP in cellule coltivate in ipossia in presenza di molecole protettive. Nessun effetto è stato osservato a carico di questi due parametri, essendo le molecole

analizzate incapaci di proteggere dal calo dell'attività COX (figura 9a e 9b) o preservare i livelli di ATP in ipossia (figura 9c).

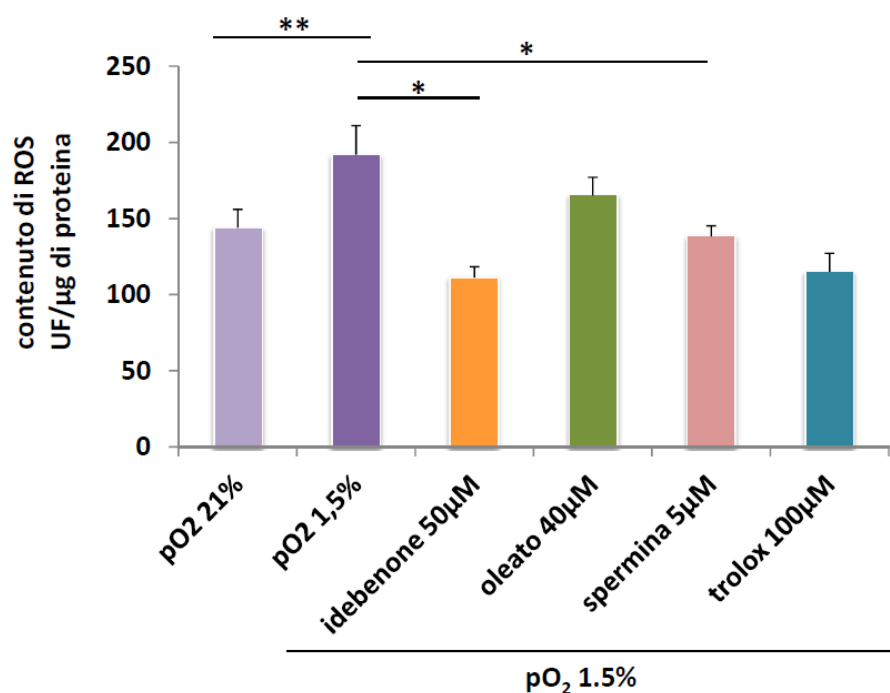


Figura 8. Effetto di molecole ad azione protettiva sulla generazione di ROS in cellule PC12 esposte all'ipossia. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO₂ 1.5% e idebenone, oleato, spermina o trolox. Il potere antiossidante di ciascuna molecola è stato valutato misurando la capacità di contrastare l'incremento dei ROS indotto dall'esposizione all'ipossia. La quantità di ROS presenti nei campioni è stata valutata misurando la fluorescenza emessa dalla sonda H₂DCF-DA. Il contenuto intracellulare di ROS è stato espresso come unità di fluorescenza (UF) emessa per μg di proteina. L'istogramma mostra il valore medio ± deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. ** (p < 0.01) e * (p < 0.05) indicano la significatività statistica dei dati.

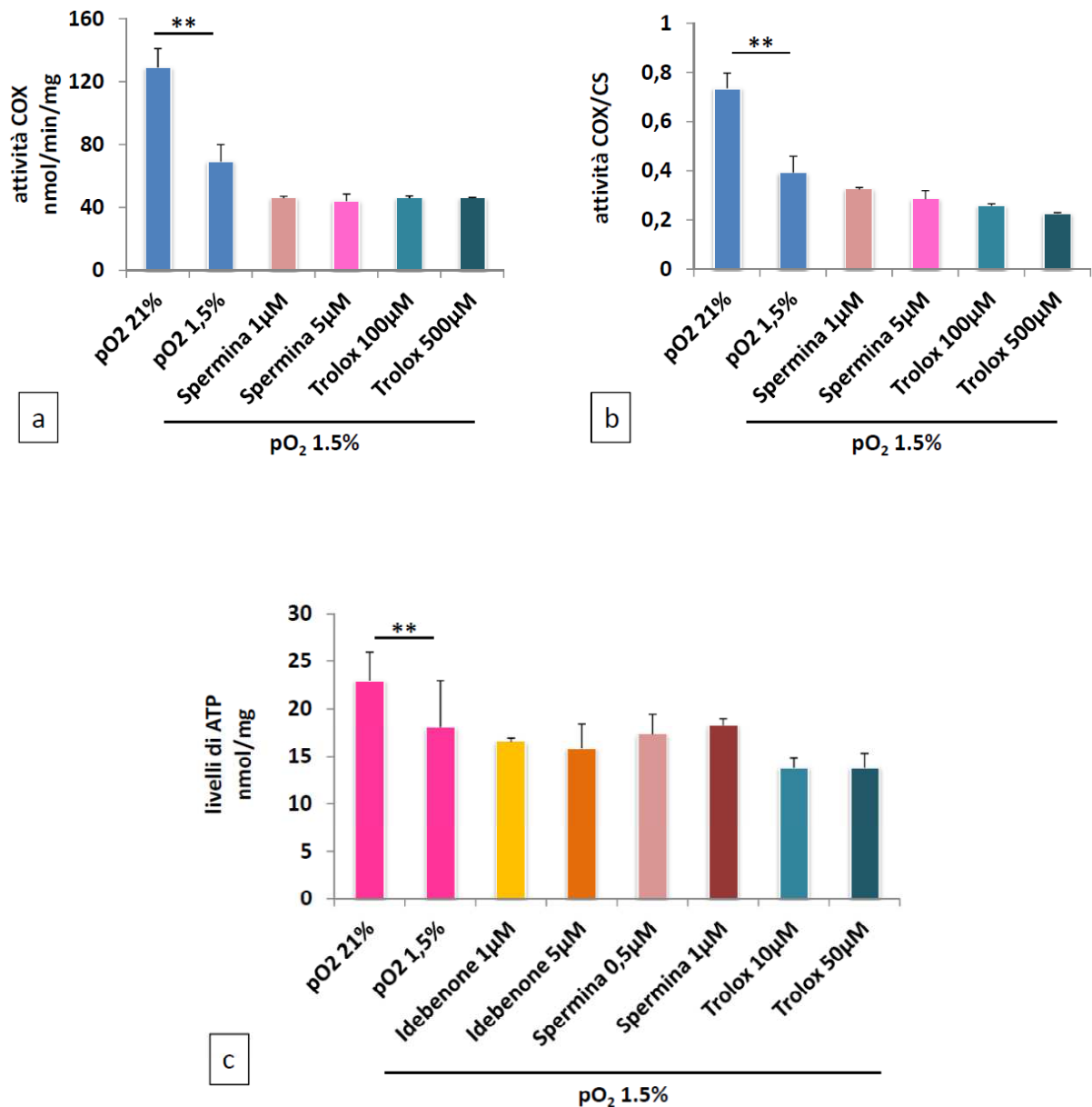


Figura 9. Effetto di molecole ad azione protettiva sull'attività della citocromo C ossidasi (COX) (a e b) e sui livelli di ATP (c) in cellule PC12 esposte all'ipossia. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO₂ 1.5% e di idebenone, spermina o trolox. Il potere protettivo di ciascuna molecola è stato valutato misurando la capacità di contrastare la riduzione dell'attività COX (a e b) o la deplezione dei livelli di ATP (c) indotti dall'esposizione all'ipossia. L'attività enzimatica è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'ossidazione del citocromo c ridotto (Cit.C_{red}) ed espressa come numero di moli di Cit.C_{red} ossidate nell'unità di tempo per mg di proteina (a). L'attività COX è stata normalizzata sull'attività della citrato sintasi (CS) (b). Il contenuto di ATP è stato misurato mediante metodo luminometrico ed espresso come numero di moli di ATP per mg di proteina (c). Gli istogrammi mostrano il valore medio ± deviazione standard di due esperimenti indipendenti. ** (p<0.01) indica la significatività statistica dei dati.

3. Azione congiunta dell'ipossia e del peptide β -amilode₁₋₄₂

La caratterizzazione del sistema cellulare in ipossia ci ha consentito di dimostrare che le cellule PC12 coltivate per 24 h a pO₂ 1.5% sono caratterizzate da una alterazione del profilo energetico e dello stato redox. La riduzione dell'attività della COX e della fosforilazione ossidativa indotte dall'ipossia contribuiscono al deficit energetico, mentre l'incremento delle ROS e l'attivazione dei sistemi di protezione sono un indice di uno stato ossidativo alterato. Queste alterazioni funzionali sono compatibili con un profilo di tipo neurodegenerativo e rendono il nostro sistema cellulare un modello utile per lo studio dell'azione congiunta di ipossia e β -amilode.

Abbiamo pertanto proseguito con lo studio dell'azione del peptide A β da solo o in associazione con l'ipossia, analizzandone gli effetti sull'attività COX, la OXPHOS, i livelli intracellulari di ATP e il contenuto di specie reattive dell'ossigeno.

3.1. Modalità di risospensione e conservazione del peptide A β ₁₋₄₂

Prima di procedere con la sperimentazione degli effetti del peptide A β sui parametri funzionali analizzati, abbiamo ricercato le migliori condizioni di solubilizzazione e conservazione del peptide. Basandoci soprattutto sui dati riportati in letteratura, abbiamo scelto di risospendere il peptide in dimetilsolfossido (DMSO) e di conservarlo per non più di 14 giorni a -20°C. Queste modalità di risospensione e conservazione ci hanno consentito di ottenere una soluzione composta principalmente da forme monometriche, dimeriche e trimeriche del peptide A β ₁₋₄₂, come evidenziato da una analisi elettroforetica.

3.2. Scelta della concentrazione del peptide A β ₁₋₄₂

Dopo aver individuato quale fosse la modalità migliore di risospensione del peptide ai fini della nostra sperimentazione, abbiamo proceduto con l'identificazione della concentrazione di A β da utilizzare durante gli esperimenti. Così come abbiamo fatto per la scelta della pO₂, anche in questo caso abbiamo utilizzato l'attività enzimatica della COX come parametro

funzionale di riferimento. A tale scopo le cellule PC12 sono state coltivate in normossia per 24 h in presenza di concentrazioni crescenti di peptide A β .

Il peptide A β è in grado di interferire con l'attività COX a partire da una concentrazione pari a 5 μ M, per la quale abbiamo osservato un calo dell'attività enzimatica del 10% (n.s.) rispetto al controllo non trattato. Abbiamo però scelto di utilizzare nei nostri esperimenti il peptide A β alla concentrazione di 10 μ M, in quanto questa condizione ci ha consentito di osservare un calo dell'attività più sostenuto (-22%, $p < 0.05$) e statisticamente significativo (figura 10a). Il risultato è stato confermato anche dopo la normalizzazione (figura 10c) rispetto alla massa mitocondriale (figura 10b).

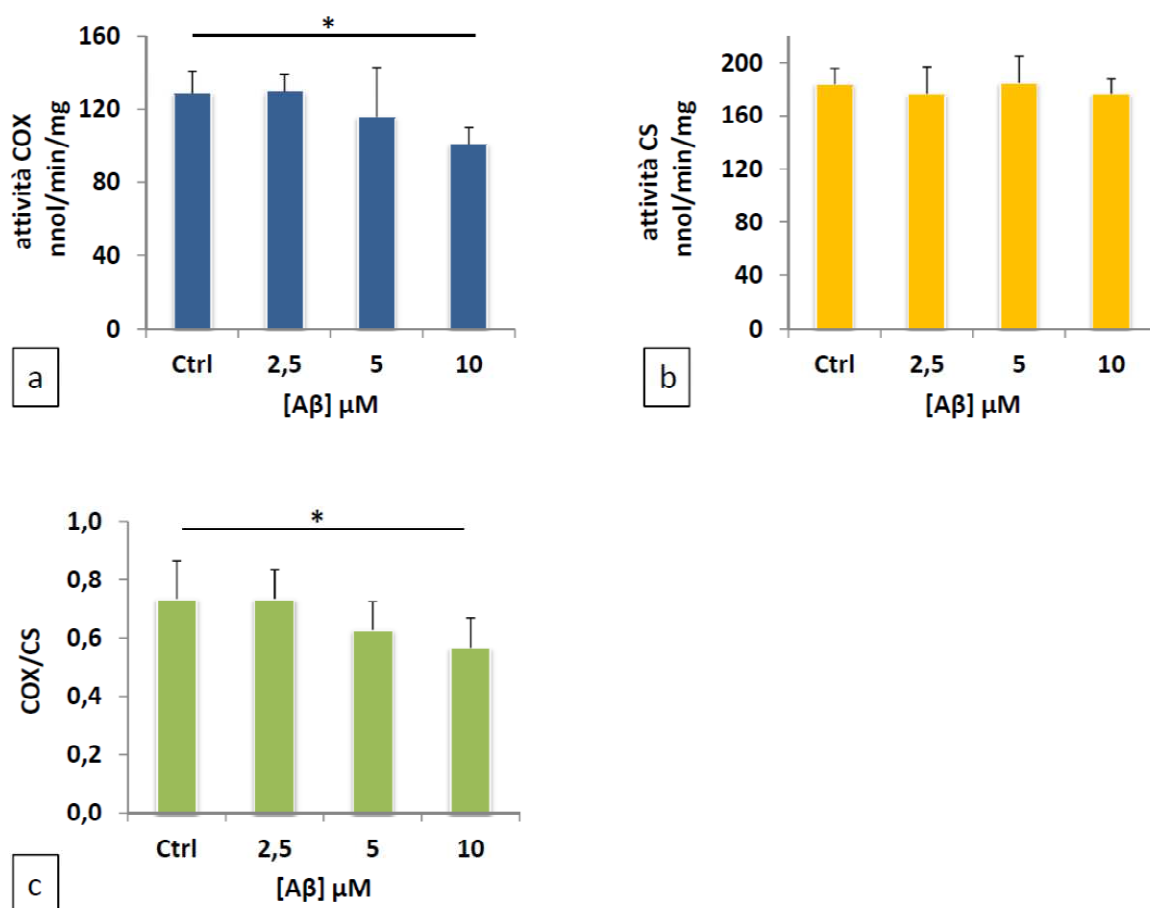


Figura 10. Dipendenza dell'attività citocromo c ossidasi (COX) dalla concentrazione di peptide A β . Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in presenza di pO $_2$ 21% e concentrazioni crescenti di peptide A β . L'attività enzimatica è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'ossidazione del citocromo c ridotto (Cit.C $_{red}$) ed espressa come numero di moli di Cit.C $_{red}$ ossidate nell'unità di tempo per mg di proteina (a). L'attività COX è stata normalizzata (c) sull'attività della citrato sintasi (CS) (b). Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. *($p < 0.05$) indica la significatività statistica dei dati.

3.3. Azione congiunta del peptide β -amiloide e dell'ipossia sull'attività COX

In questo paragrafo sono sintetizzati i risultati ottenuti nelle fasi di settaggio delle condizioni sperimentali, durante le quali abbiamo utilizzato l'attività COX come parametro funzionale di riferimento. La figura 11 mostra infatti l'effetto sull'attività COX dell'ipossia (-46%, $p < 0.01$) e del peptide $A\beta$ (-22%, $p < 0.05$), già commentati nei paragrafi precedenti. In questa fase dello studio abbiamo però introdotto anche l'analisi degli effetti derivanti dell'esposizione congiunta ai due fattori di danno.

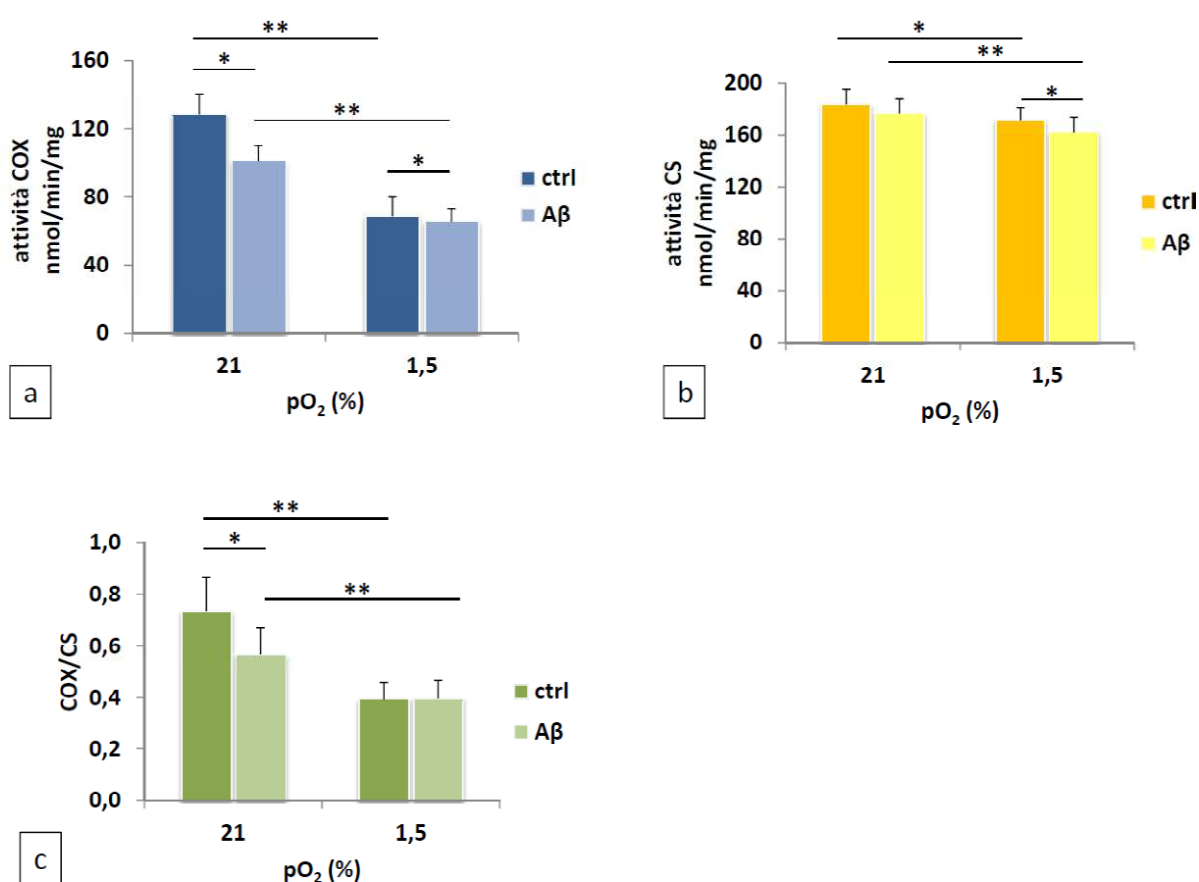


Figura 11. Azione congiunta del peptide β -amiloide e dell'ipossia sull'attività COX. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in assenza (ctrl) o presenza di $A\beta$ 10 μ M ($A\beta$), in condizioni normossiche (pO_2 21%) e ipossiche (pO_2 1.5%). L'attività enzimatica è stata determinata spettrofotometricamente seguendo l'ossidazione del citocromo c ridotto (Cit. C_{red}) ed espressa come numero di moli di Cit. C_{red} ossidate nell'unità di tempo per mg di proteina (a). L'attività COX è stata normalizzata (c) sull'attività della citrato sintasi (CS) (b). Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard di cinque esperimenti indipendenti. **($p < 0.01$) e *($p < 0.05$) indicano la significatività statistica dei dati.

Ipossia e A β mostrano per questo parametro solo un debole effetto congiunto. L'azione dannosa del peptide, chiaramente riscontrata in normossia, diventa meno evidente in ipossia, producendo un calo dell'attività COX del 7% ($p < 0.05$) rispetto al controllo ipossico (figura 11a). La presenza di A β sembra inoltre essere associata a una moderata riduzione della massa mitocondriale in ipossia (-5%, $p < 0.01$) (figura 11b). Pertanto, la normalizzazione sulla citrato sintasi conferma il calo di attività COX correlato alla A β in normossia, ma annulla l'effetto del peptide in ipossia (figura 11c).

3.4. Azione congiunta del peptide β -amiloide e dell'ipossia sul contenuto intracellulare di ATP e sulla fosforilazione ossidativa

Abbiamo proseguito la valutazione delle alterazioni di carattere bioenergetico misurando i livelli intracellulari di ATP. L'istogramma riportato in figura 12 mostra chiaramente la presenza di un'azione congiunta del peptide A β e dell'ipossia. L'incubazione delle cellule in presenza del peptide A β determina una riduzione dei livelli di ATP sia in condizioni normossiche (-13%, $p < 0.01$) che ipossiche (-10%, $p < 0.05$). Quando però sia il peptide A β che l'ipossia sono presenti si osserva una significativa riduzione (-30% rispetto al controllo normossico non trattato, $p < 0.05$), che sembra essere il risultato di un effetto additivo derivante dalla somma dei singoli effetti indotti dalla A β (-13%, $p < 0.01$) e dall'ipossia (-22%, $p < 0.01$) (figura 12).

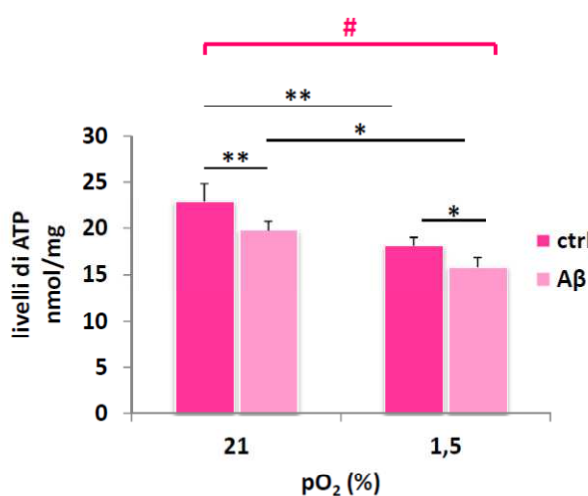


Figura 12. Azione congiunta del peptide β -amiloide e dell'ipossia sul contenuto intracellulare di ATP. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in assenza (ctrl) o presenza di A β 10 μ M (A β), in condizioni normossiche (pO₂ 21%) e ipossiche (pO₂ 1.5%). Il contenuto di ATP è stato misurato mediante metodo luminometrico ed espresso come numero di moli di ATP per mg di proteina. L'istogramma mostra il valore medio \pm deviazione standard cinque esperimenti indipendenti. **($p < 0.01$) e *,# ($p < 0.05$) indicano la significatività statistica dei dati.

Avendo dimostrato che la presenza di A β è associata alla riduzione della disponibilità dell'ATP intracellulare, abbiamo approfondito lo studio valutando gli effetti del peptide sulla velocità di sintesi dell'ATP mitocondriale. Come risulta evidente in figura 13, la A β non sembra avere alcun effetto di tipo inibitorio sul processo di fosforilazione ossidativa nelle nostre condizioni sperimentali (figura 13a e 13c).

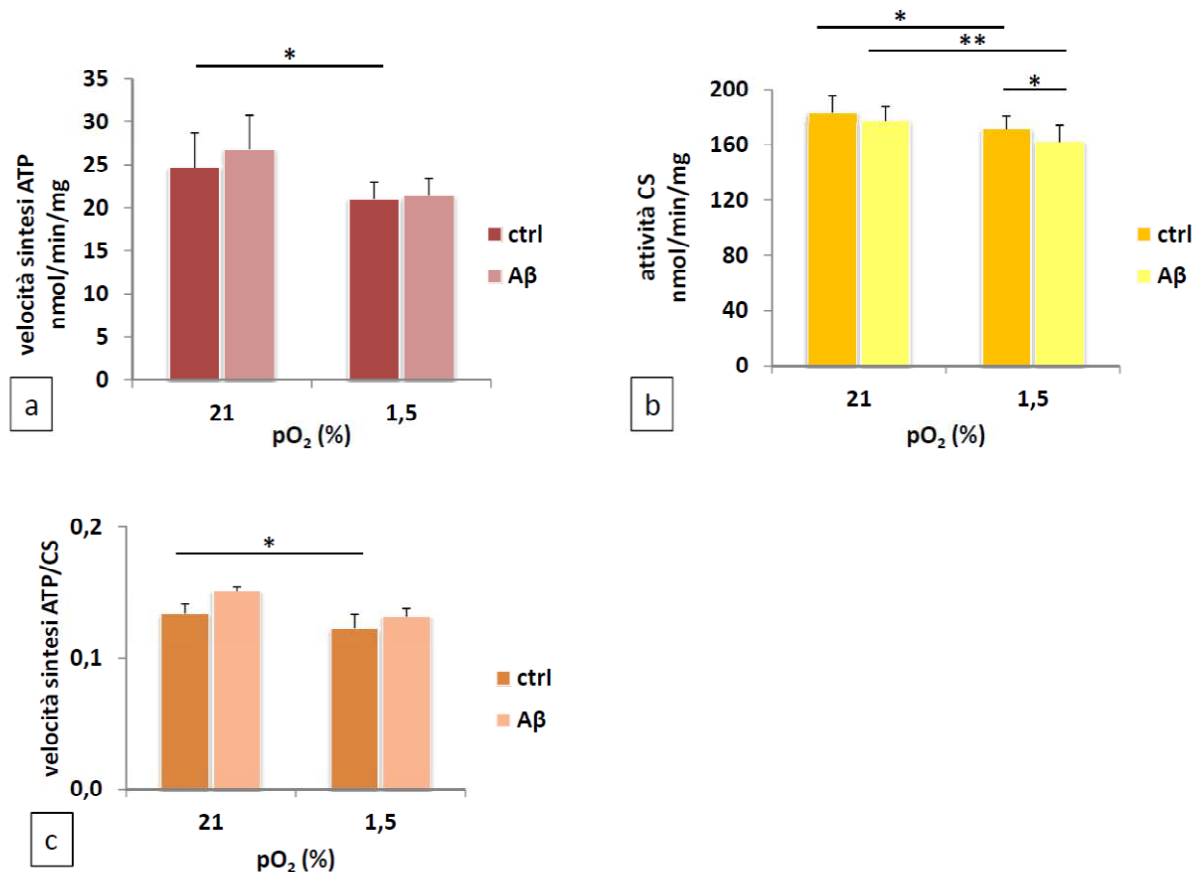


Figura 13. Azione congiunta del peptide β -amiloide e dell'ipossia sulla velocità di sintesi dell'ATP mitocondriale. Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in assenza (ctrl) o presenza di A β 10 μ M (A β), in condizioni normossiche (pO₂ 21%) e ipossiche (pO₂ 1.5%). La velocità di sintesi dell'ATP NADH-dipendente è stata valutata in cellule permeabilizzate con digitonina ed energizzate con glutammato/malato in presenza di ADP. La velocità di sintesi è stata espressa come numero di moli di ATP prodotte nell'unità di tempo per mg di proteina (a). La velocità di sintesi è stata normalizzata (c) sull'attività della citrato sintasi (CS) (b). Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard di tre esperimenti indipendenti. *($p < 0.05$) indica la significatività statistica dei dati.

3.5. Azione congiunta del peptide β -amiloide e dell'ipossia sul contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

L'ultimo parametro analizzato in questa fase dello studio è rappresentato dai livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno. La presenza del peptide A β determina un incremento del contenuto di ROS sia a pO₂ 21% (+10%, p<0.05) che a pO₂ 1.5% (+13%, p<0.05). Quando le cellule sono esposte contemporaneamente al peptide e all'ipossia, si ottiene un aumento dei livelli di ROS pari al 51% (p<0.01), suggerendo anche in questo caso un effetto additivo di ipossia (+33%, p<0.01) e A β (+10%, p<0.05) (figura 14).

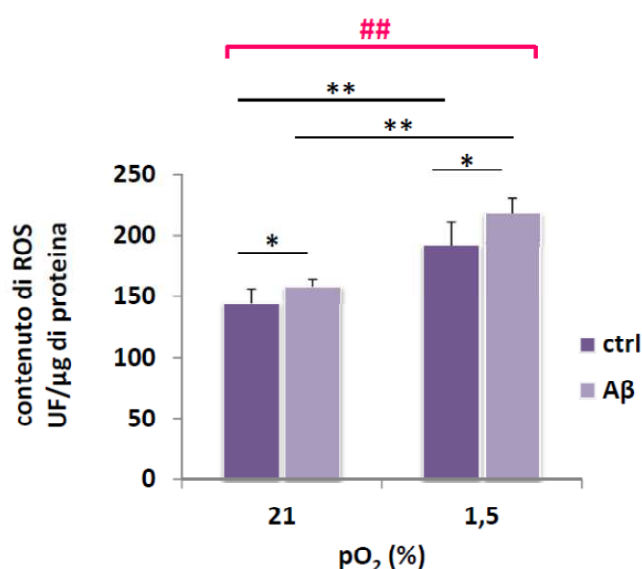


Figura 14. Azione congiunta del peptide β -amiloide e dell'ipossia sul contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Cellule PC12 sono state coltivate per 24 h in assenza (ctrl) o presenza di A β 10 μ M (A β), in condizioni normossiche (pO₂ 21%) e ipossiche (pO₂ 1.5%). La quantità di ROS presenti nei campioni è stata valutata misurando la fluorescenza emessa dalla sonda H₂DCF-DA. Il contenuto intracellulare di ROS è stato espresso come unità di fluorescenza (UF) emessa per μ g di proteina. L'istogramma mostra il valore medio \pm deviazione standard tre esperimenti indipendenti. **,##(p<0.01) e *(p<0.05) indicano la significatività statistica dei dati.

3.6. Effetto di molecole ad azione protettiva su cellule trattate con il peptide β -amiloide in presenza di ipossia

Nella fase di settaggio abbiamo testato le proprietà antiossidanti di alcune molecole ad azione protettiva sul nostro modello cellulare esposto all'ipossia. Avendo osservato che queste molecole sono in grado di contrastare in varia misura la produzione dei ROS indotta dall'ipossia, abbiamo deciso di testarne la capacità protettiva anche sulle cellule esposte contestualmente all'ipossia e al peptide A β . Osservando l'istogramma in figura 15, è possibile concludere che l'oleato, la spermina e il trolox perdono gran parte della loro capacità antiossidante quando le cellule sono esposte ad entrambi i fattori di danno. Solo l'idebenone conserva la sua capacità antiossidante, la quale risulta comunque ridotta rispetto a quella mostrata quando le cellule erano esposte alla sola ipossia (figura 15).

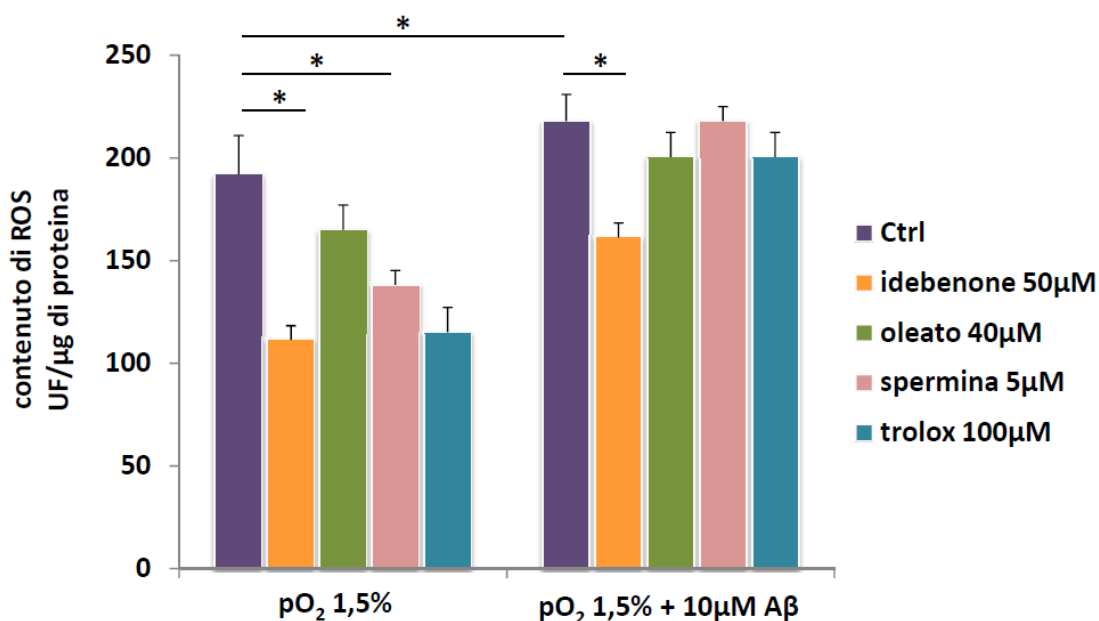


Figura 15. Effetto di molecole ad azione protettiva su cellule trattate con il peptide β -amiloide in presenza di ipossia. Le barre viola rappresentano i campioni coltivati in assenza di sostanze protettive (Ctrl). Il gruppo di barre a sinistra riporta gli effetti del trattamento con le sostanze in esame delle cellule esposte alla sola ipossia (pO₂ 1.5%). Il gruppo di barre a destra riporta gli effetti del trattamento con le sostanze in esame delle cellule esposte contestualmente ad ipossia e peptide A β (pO₂ 1.5% + 10μM A β). Tutti i trattamenti sono stati condotti per 24 h. La quantità di ROS presenti nei campioni è stata valutata misurando la fluorescenza emessa dalla sonda H₂DCF-DA. Il contenuto intracellulare di ROS è stato espresso come unità di fluorescenza (UF) emessa per μg di proteina. L'istogramma mostra il valore medio \pm deviazione standard due esperimenti indipendenti. *(p<0.05) indica la significatività statistica dei dati.

Parte II - Fibroblasti di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer

I risultati ottenuti nella prima fase dello studio hanno messo in evidenza il potenziale effetto additivo dell'ipossia e del peptide A β . Questi due fattori contribuiscono congiuntamente alla riduzione della disponibilità energetica e all'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno. Tali fenomeni potrebbero sostenere il processo di morte cellulare che caratterizza la malattia di Alzheimer.

Per consolidare i risultati ottenuti nello studio condotto sulle cellule PC12, abbiamo introdotto un nuovo modello sperimentale rappresentato da fibroblasti prelevati da pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer.

1. Disegno sperimentale

In questa fase dello studio abbiamo utilizzato come modello cellulare linee di fibroblasti primari prelevati da pazienti ai quali è stata diagnosticata una forma familiare della malattia di Alzheimer (AD). Tali diagnosi è derivata dall'individuazione, mediante analisi molecolare, di mutazioni a carico dei geni codificanti per la proteina precursore della β -amiloide (APP, *Amyloid Precursor Protein*) e per la presenilina (PSEN). Nello studio sono state inserite 5 linee di fibroblasti con mutazione in APP e 5 linee di fibroblasti con mutazione nel gene della PSEN. Fibroblasti prelevati da 5 soggetti sani con età paragonabile a quella dei soggetti affetti da AD sono stati usati come controllo (tabella 1).

Durante la sperimentazione i fibroblasti sono stati seminati in un mezzo di coltura contenente glucosio 25 mM per favorire l'adesione delle cellule alla piastra; dopo 12 h, il terreno di coltura è stato sostituito con un mezzo fresco contenente glucosio 5 mM. Per le

successive 72 h i fibroblasti sono stati incubati in normossia (pO₂ 21%) o ipossia (pO₂ 1%). Tutti gli esperimenti sono stati condotti su fibroblasti al 15°-16° passaggio di duplicazione.

	Gruppo #1	Gruppo #2	Gruppo #3	Gruppo #4	Gruppo #5
Ctrl	52	44	55	41	28
APP	53	42	53	46	28
PSEN	56	43	75	43	27

Tabella 1. Età dei pazienti al momento della biopsia. I fibroblasti su cui è stata condotta la sperimentazione derivano da biopsie della cute. I pazienti da cui i fibroblasti sono stati isolati sono in cura presso il dipartimento di neurobiologia del Karolinska Institutet.

2. Attività dell'enzima citrato sintasi e network mitocondriale

L'obiettivo di questo studio era di analizzare i principali parametri bioenergetici di fibroblasti di pazienti AD in risposta a condizioni di limitata disponibilità di ossigeno. Poiché l'ipossia influenza primariamente la funzionalità mitocondriale, abbiamo innanzitutto misurato l'attività dell'enzima citrato sintasi (CS).

La riduzione della disponibilità di ossigeno determina in tutte le linee cellulari un significativo calo della massa mitocondriale. Abbiamo infatti riscontrato in seguito all'esposizione all'ipossia una riduzione dell'attività della CS del 53% (p<0.05) e del 67% (p<0.01) nei fibroblasti controllo e AD rispettivamente (figura 1a). L'attività della CS nei fibroblasti di pazienti AD non differisce da quella dei fibroblasti controllo sia in condizioni normossiche che ipossiche. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nei valori di CS delle linee mutate in APP e PSEN (figura 1b).

La riduzione della massa mitocondriale indotta dall'ipossia è confermata anche dalle immagini ottenute in microscopia di fluorescenza. La fluorescenza emessa dalla TMRM, accumulatasi all'interno dei mitocondri, dimostra che dopo l'esposizione all'ipossia tutte le linee di fibroblasti contengono un numero inferiore di mitocondri e che la quantità e la distribuzione di questi ultimi all'interno della cellula non differiscono significativamente tra fibroblasti AD e controlli (figura 2).

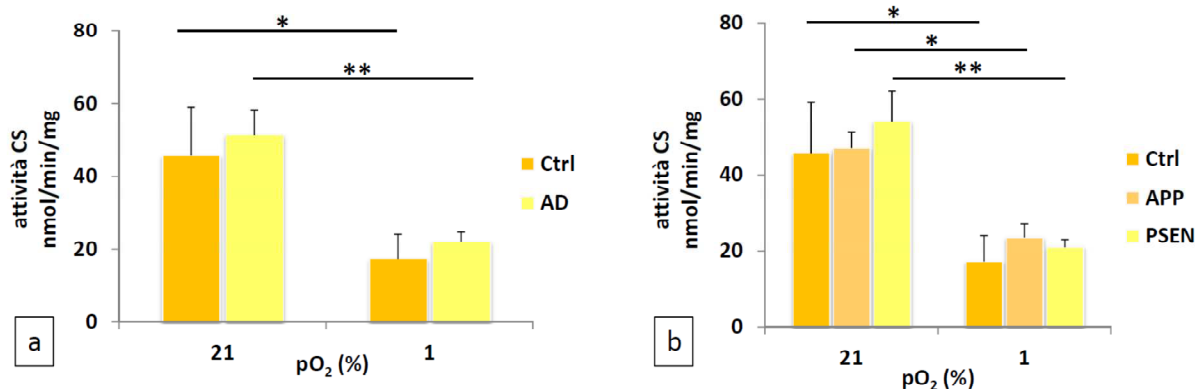


Figura 1. Attività dell'enzima citrato sintasi nei fibroblasti AD e controlli esposti all'ipossia. I fibroblasti sono stati seminati in DMEM contenente glucosio 25mM; dopo 12h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente glucosio 5mM. I fibroblasti sono stati incubati per 72h in condizioni normossiche (pO₂ 21%) e ipossiche (pO₂ 1%). L'attività enzimatica è stata determinata spettrofotometricamente seguendo la riduzione dell'acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) a 412 nm ed espressa come numero di moli di DTNB ridotte nell'unità di tempo per mg di proteina. Nella figura (a) è riportata la media dei valori di CS ottenuti in tutte le linee mutate (AD); nella figura (b) sono riportati i valori di CS per singolo peptide mutato. Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ indicano la significatività statistica dei dati.

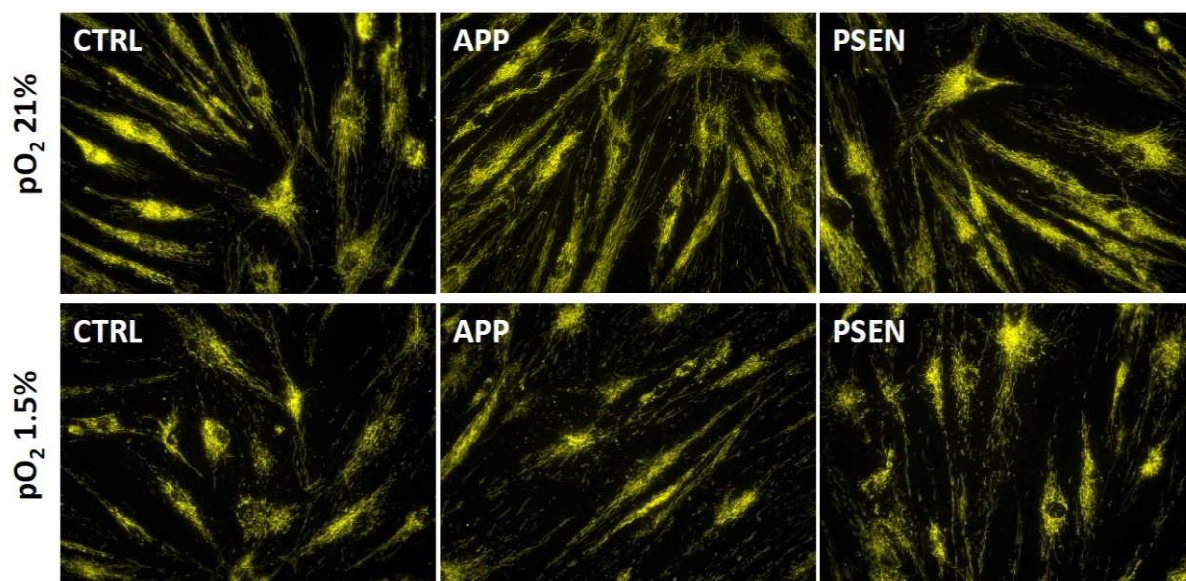


Figura 2. Effetto dell'ipossia sulla massa e la morfologia mitocondriale nei fibroblasti AD e controlli. I fibroblasti sono stati seminati in DMEM contenente glucosio 25mM; dopo 12h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente glucosio 5mM. I fibroblasti sono stati incubati per 72h in condizioni normossiche (pO₂ 21%) e ipossiche (pO₂ 1%). Il network mitocondriale è stato valutato incubando i fibroblasti in presenza di TMRM 0.1 μ M per 10 minuti. Le immagini sono state ottenute con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento 40X).

3. Contenuto intracellulare di ATP

Poiché la deregolazione del metabolismo energetico è una delle caratteristiche biochimiche della malattia di Alzheimer, abbiamo proceduto con la nostra indagine misurando i livelli intracellulari di ATP. In accordo con i risultati ottenuti sulle cellule PC12 e coerentemente con quanto riportato in letteratura, in condizioni normossiche abbiamo riscontrato una riduzione del 22% ($p < 0.05$) dei livelli intracellulari di ATP nei fibroblasti AD rispetto ai controlli. Sia i fibroblasti AD che i controlli mostrano in ipossia una deplezione dell'ATP intracellulare con una riduzione dei livelli del 22% ($p < 0.05$) e del 24% ($p < 0.01$) rispetto ai campioni coltivati in normossia. Complessivamente, nei fibroblasti AD l'esposizione per 72h a pO_2 1% determina una considerevole riduzione del contenuto di ATP, con un decremento del 24% rispetto ai fibroblasti controllo esposti all'ipossia e del 40% rispetto ai controlli coltivati in normossia (figura 3a). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra valori del contenuto intracellulare di ATP delle linee mutate in APP e PSEN (figura 3b).

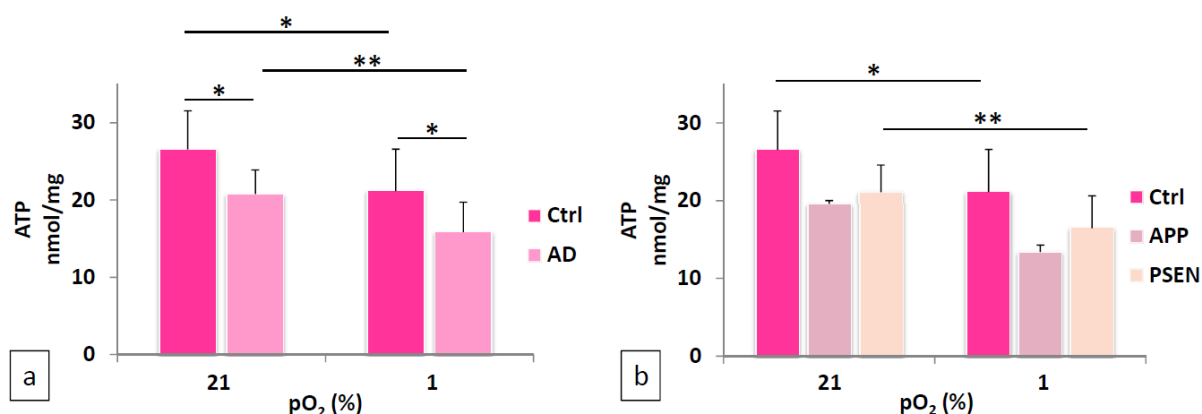


Figura 3. Contenuto intracellulare di ATP nei fibroblasti AD e controlli esposti all'ipossia. I fibroblasti sono stati seminati in DMEM contenente glucosio 25mM; dopo 12h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente glucosio 5mM. I fibroblasti sono stati incubati per 72h in condizioni normossiche (pO_2 21%) e ipossiche (pO_2 1%). Il contenuto di ATP è stato misurato mediante metodo luminometrico ed espresso come numero di moli di ATP per mg di proteina. Nella figura (a) è riportata la media dei livelli di ATP ottenuti in tutte le linee mutate (AD); nella figura (b) sono riportati i livelli di ATP per singolo peptide mutato. Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ indicano la significatività statistica dei dati.

4. Consumo di glucosio e produzione di lattato

Avendo riscontrato un calo significativo del contenuto intracellulare di ATP nei fibroblasti AD, abbiamo deciso di misurare il consumo di glucosio. In condizioni normossiche, i fibroblasti AD sono caratterizzati da una riduzione del consumo di glucosio rispetto ai controlli (-18%, $p < 0.05$). Come atteso, in seguito all'esposizione all'ipossia sia i fibroblasti controllo che i fibroblasti AD mostrano un aumento del consumo di glucosio del 20% ($p < 0.05$) e del 30% ($p < 0.01$) rispettivamente. Anche in ipossia, la quantità di glucosio consumato rimane comunque più bassa nei fibroblasti AD (-12%, $p < 0.05$) (figura 4a).

Abbiamo inoltre misurato la quantità di lattato prodotto nelle stesse condizioni sperimentali. Coerentemente con i risultati ottenuti per il consumo di glucosio, nei fibroblasti AD abbiamo riscontrato una riduzione della produzione di lattato rispetto ai fibroblasti controllo, sia a pO_2 21% (-26%, $p < 0.05$) che a pO_2 1% (-9%, n.s.). Quando i fibroblasti sono coltivati in condizioni ipossiche mostrano un aumento del lattato prodotto, con un incremento del 40% ($p < 0.05$) nei fibroblasti controllo e del 74% ($p < 0.01$) nei fibroblasti AD (figura 4b).

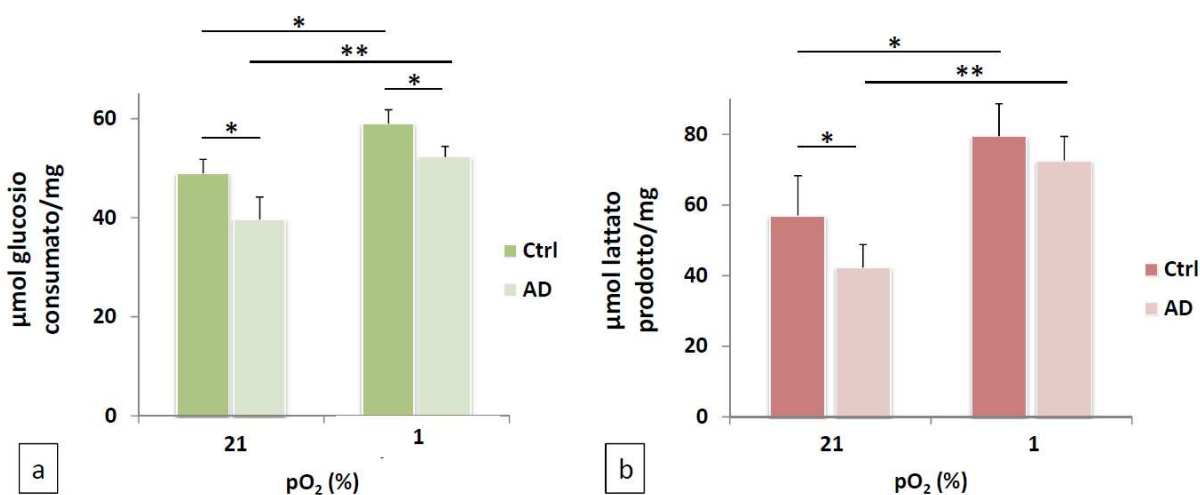


Figura 4. Consumo di glucosio e produzione di lattato nei fibroblasti AD e controlli esposti all'ipossia. I fibroblasti sono stati seminati in DMEM contenente glucosio 25mM; dopo 12h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente glucosio 5mM. I fibroblasti sono stati incubati per 72h in condizioni normossiche (pO_2 21%) e ipossiche (pO_2 1%). Le quantità di glucosio consumato e di lattato prodotto sono state misurate mediante metodo colorimetrico ed espresse come μmol di glucosio consumato (a) e μmol di lattato prodotto (b) per mg di proteina. Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ indicano la significatività statistica dei dati.

5. Potenziale della membrana mitocondriale interna

La misura del potenziale della membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) può essere considerata un indice dell'efficienza della funzionalità mitocondriale. Poiché le alterazioni della funzionalità mitocondriale rappresentano un evento cruciale della patogenesi dell'AD, abbiamo ritenuto opportuno valutare lo stato del $\Delta\psi_m$ nei fibroblasti AD.

In condizioni normossiche i fibroblasti AD sono caratterizzati da un $\Delta\psi_m$ significativamente più basso di quello riscontrato nei fibroblasti controllo (-24%, $p < 0.05$), dimostrato dalla riduzione della fluorescenza emessa dalla sonda TMRM. Il dato più interessante è però rappresentato dagli effetti dell'ipossia. Nei fibroblasti AD il $\Delta\psi_m$ è ulteriormente ridotto dall'esposizione all'ipossia, riportando un calo del 33% rispetto ai fibroblasti controllo esposti all'ipossia ($p < 0.05$) e del 70% rispetto ai controlli coltivati in normossia (figura 5a). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra valori di $\Delta\psi_m$ delle linee mutate in APP e PSEN (figura 5b).

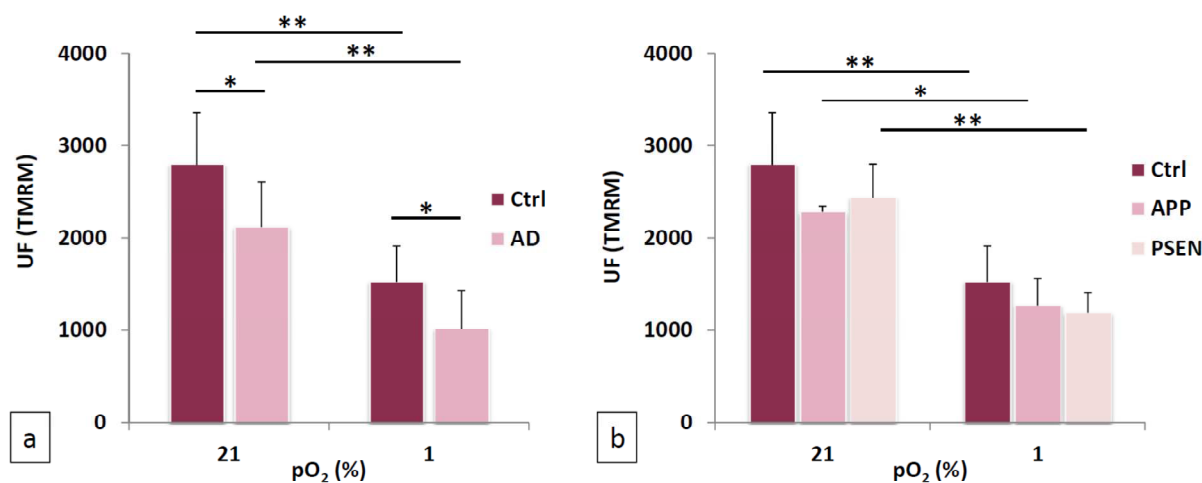


Figura 5. Potenziale della membrana interna mitocondriale ($\Delta\psi_m$) nei fibroblasti AD e controlli esposti all'ipossia. I fibroblasti sono stati seminati in DMEM contenente glucosio 25mM; dopo 12h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente glucosio 5mM. I fibroblasti sono stati incubati per 72h in condizioni normossiche (pO₂ 21%) e ipossiche (pO₂ 1%). Il valore di $\Delta\psi_m$ è stato stimato mediante l'uso della sonda fluorescente tetrametilrodamina metil-estere (TMRM), che viene rapidamente sequestrata all'interno dei mitocondri per effetto del potenziale di membrana. Il valore di $\Delta\psi_m$ è stato espresso in termini di unità di fluorescenza (UF) emessa dalla TMRM. Nella figura (a) è riportata la media dei valori di $\Delta\psi_m$ ottenuti in tutte le linee mutate (AD); nella figura (b) sono riportati i valori di $\Delta\psi_m$ per singolo peptide mutato. Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard; * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ indicano la significatività statistica dei dati.

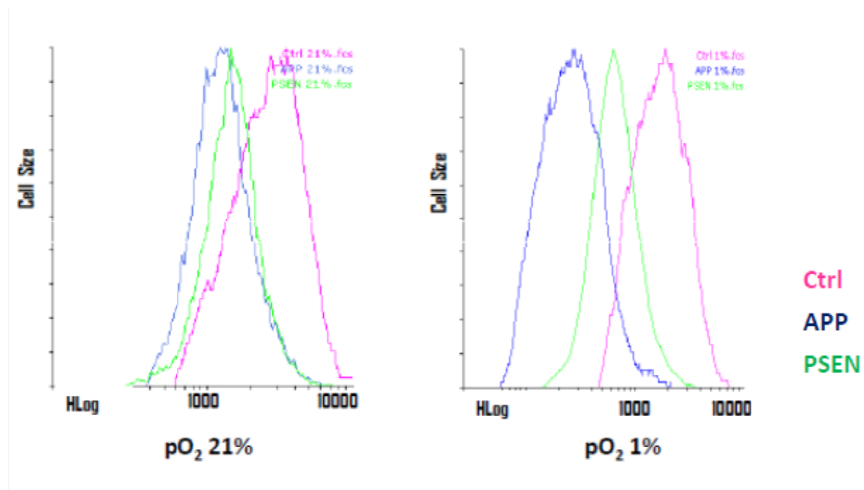


Figura 6. Analisi citofluorimetrica del potenziale delle membrana mitocondriale interna. Dopo aver trattato i fibroblasti con la sonda TMRM, la fluorescenza emessa è stata misurata mediante il citometro Muse® Cell Analyzer. I valori di fluorescenza sono stati elaborati utilizzando il software Flowing 3.1. Gli istogrammi mostrano una riduzione dell'intensità di fluorescenza emessa a carico dei fibroblasti con mutazione in APP e in PSEN rispetto ai controlli, sia in normossia che in ipossia.

Il potenziale della membrana mitocondriale è influenzato dallo stato di attività del mitocondrio: il $\Delta\psi_m$ tende a ridursi in presenza di una sostenuta attività fosforilativa (stato 3) e ad aumentare quando la sintesi di ATP subisce un rallentamento (stato 4).

Per dimostrare se la riduzione di $\Delta\psi_m$ osservata nei fibroblasti AD sia dovuta alla presenza di un differente stato della respirazione o alla presenza di un potenziale endogeno effettivamente più basso, abbiamo misurato il $\Delta\psi_m$ dei fibroblasti in seguito all'incubazione con oligomicina. L'oligomicina, inibendo il passaggio dei protoni attraverso l'ATP ad opera dell'ATP sintasi, induce l'instaurarsi dello stato 4 della respirazione e l'aumento del $\Delta\psi_m$, che assume il massimo valore raggiungibile. Il $\Delta\psi_m$ misurato dopo l'incubazione con oligomicina ha confermato le differenze riscontrate tra fibroblasti AD e controlli, dal momento che in presenza dell'inibitore i livelli di $\Delta\psi_m$ assumono valori paragonabili a quelli ottenuti in assenza dello stesso sia in condizioni normossiche, sia ipossiche (figura 7).

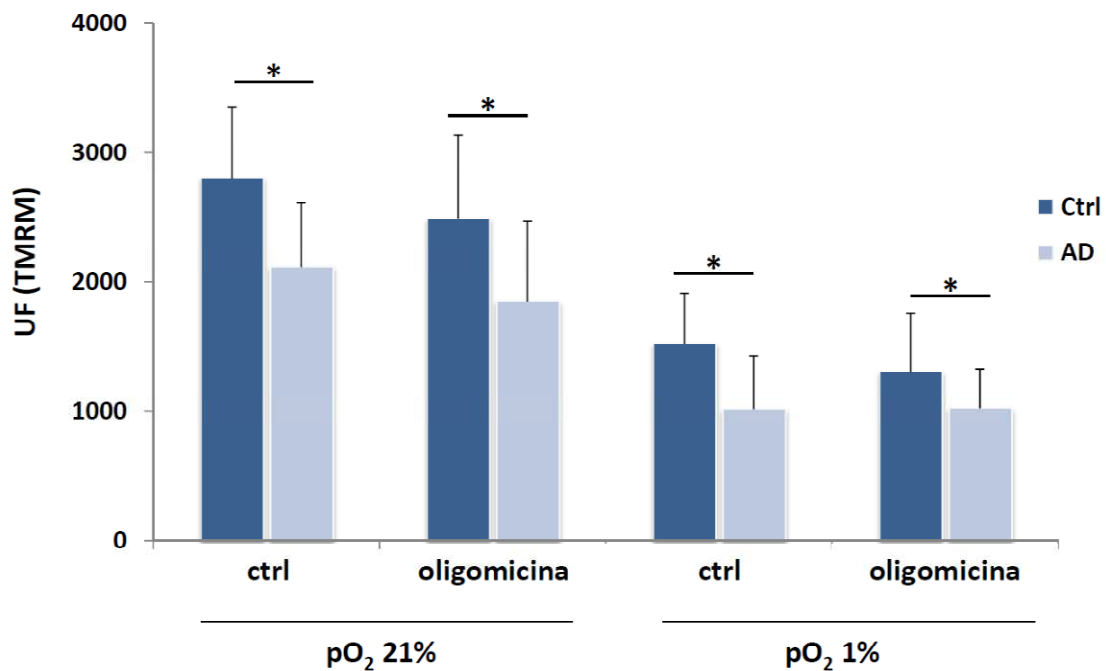


Figura 7. Effetto dell'oligomicina sul potenziale della membrana interna mitocondriale ($\Delta\psi_m$) nei fibroblasti AD e controlli esposti all'ipossia. I fibroblasti sono stati seminati in DMEM contenente glucosio 25mM; dopo 12h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente glucosio 5mM. I fibroblasti sono stati incubati per 72h in condizioni normossiche (pO_2 21%) e ipossiche (pO_2 1%). Alla scadenza delle 72 h, le cellule sono state incubate per 30 minuti in assenza (ctrl) o presenza di oligomicina (oligomycin) e immediatamente dopo trattate con la sonda fluorescente tetrametilrodamina metil-estere (TMRM). Il valore di $\Delta\psi_m$ è stato espresso in termini di unità di fluorescenza (UF) emessa dalla TMRM. Nella figura è riportata la media dei valori di $\Delta\psi_m$ ottenuti in tutte le linee mutate (AD). Gli istogrammi mostrano il valore medio \pm deviazione standard; *($p < 0.05$) indica la significatività statistica dei dati.

6. Contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno

L'ultimo parametro analizzato è rappresentato dal contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Nelle nostre condizioni sperimentali i fibroblasti AD e controllo mostrano in normossia lo stesso contenuto di ROS; tuttavia essi rispondono in maniera differente all'ipossia. Infatti, mentre nei controlli l'ipossia determina una riduzione dei ROS del 30% ($p < 0.01$), nei fibroblasti AD induce un calo solo del 14% ($p < 0.01$). Quando sono esposti all'ipossia, i fibroblasti AD sono dunque caratterizzati da un aumento dei livelli di ROS rispetto ai controlli (+30%, $p < 0.05$) (figura 8), dovuto a un incremento della produzione degli stessi e/o a una diminuzione delle difese antiossidanti della cellula.

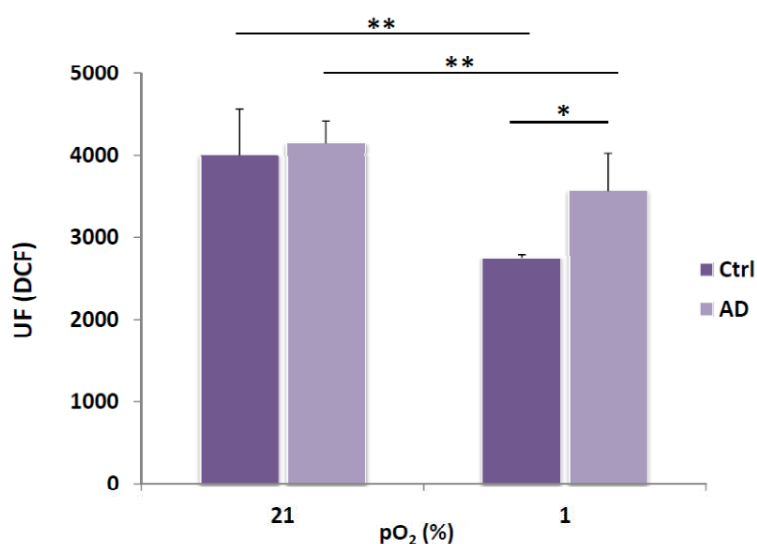


Figura 8. Contenuto intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei fibroblasti AD e controlli esposti all'ipossia. I fibroblasti sono stati seminati in DMEM contenente glucosio 25mM; dopo 12h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente glucosio 5mM. I fibroblasti sono stati incubati per 72h in condizioni normossiche (pO₂ 21%) e ipossiche (pO₂ 1%). La quantità di ROS presenti nei campioni è stata valutata misurando la fluorescenza emessa dalla sonda H₂DCF-DA. Il contenuto intracellulare di ROS è stato espresso come unità di fluorescenza (UF) emessa. L'istogramma mostra il valore medio \pm deviazione standard; **($p < 0.01$) e *($p < 0.05$) indicano la significatività statistica dei dati.

Capitolo 4

Discussione

Parte I – Linea cellulare PC12

La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa caratterizzata dalla perdita progressiva delle funzioni cognitive e rappresenta la forma più comune di demenza nella popolazione adulta [1]. Nonostante siano stati identificati numerosi meccanismi che sostengono la progressione della malattia, l'esatta eziopatogenesi rimane ancora sconosciuta.

Secondo l'ipotesi della proteina amiloide, la AD si manifesta in seguito alla formazione di placche neuritiche prevalentemente formate dalla proteina β -amiloide ($A\beta$). La $A\beta$ è un peptide altamente neurotossico derivante da un aberrante processo proteolitico a carico della proteina APP, il cui accumulo a livello extracellulare determina l'alterazione della funzionalità sinaptica e l'induzione di uno stato infiammatorio, eventi cruciali delle prime fasi della degenerazione neuronale [61]. A quest'ultima ipotesi si è affiancata recentemente la cosiddetta ipotesi vascolare, secondo cui la AD è la manifestazione di due fattori concomitanti: età avanzata e presenza di fattori di rischio vascolare. Tali condizioni comporterebbero fenomeni di ipoperfusione neuronale, dalla quale deriverebbe una complessa serie di alterazioni metaboliche, quali la disfunzione mitocondriale, lo stress ossidativo, la riduzione della disponibilità energetica, l'inefficienza della neurotrasmissione [123]. Tutti questi fattori contribuiscono a sostenere il processo di danno neuronale da cui dipende il progressivo declino cognitivo caratteristico dei pazienti AD.

Ad oggi, un'altra delle più dibattute ipotesi sull'eziologia della AD sostiene che un evento cruciale per lo sviluppo della patologia sia rappresentato dall'alterazione della funzionalità mitocondriale, che si manifesta sin dalle primissime fasi del processo neurodegenerativo [179]. È stato inoltre dimostrato che i mitocondri rappresentano un sito di accumulo del peptide A β , il quale esplica gran parte della sua azione tossica intracellulare proprio a livello mitocondriale [80]. L'alterazione della funzionalità mitocondriale può contribuire alla progressione della patologia attraverso vari meccanismi, tra cui l'alterazione dei processi di produzione dell'energia o l'eccessiva generazione di specie reattive dell'ossigeno. Di fatto, nella AD il metabolismo mitocondriale risulta profondamente alterato. In particolare, è stato dimostrato che nei pazienti AD l'attività della citocromo c ossidasi (COX) risulta sensibilmente ridotta in tutte le fasi della patologia [88], sia nei neuroni che in cellule periferiche [84], e sembra inoltre essere un target diretto della A β [83].

Il laboratorio presso il quale ho condotto il mio dottorato si è precedentemente occupato del ruolo della disfunzione mitocondriale nella AD. Nel 2002 Bosetti e collaboratori hanno dimostrato che in campioni autoptici di pazienti AD l'attività enzimatica della COX risultava ridotta del 30-35% rispetto ai controlli, senza tuttavia interferire con la velocità di sintesi di ATP mitocondriale, che rimaneva invece invariata nei neuroni di pazienti AD rispetto ai controlli [84]. Questo risultato apparentemente controverso è stato discusso sulla base dei coefficienti di controllo di flusso metabolico riportati in letteratura. In alcuni tessuti, tra cui il cervello, l'attività della COX sembra avere un controllo molto basso sulla fosforilazione ossidativa [180]. È stato inoltre dimostrato che la COX nelle cellule è presente in eccesso rispetto alla quantità richiesta per consentire la massima velocità della respirazione in condizioni normossiche [181]. Pertanto, una riduzione considerevole dell'attività COX potrebbe non essere sufficiente a determinare un calo della OXPHOS in condizioni normossiche. Tuttavia, l'attività COX potrebbe diventare determinante in presenza di una ridotta disponibilità di ossigeno (ipossia neuronale) [182], condizione che si verifica effettivamente nel cervello di pazienti AD, nei quali è stata documentata la riduzione del flusso ematico cerebrale [141].

Da numerosi studi è emerso poi che l'ipossia gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'AD contribuendo a più meccanismi patogenetici contemporaneamente [152]. Infatti, l'ipossia partecipa alla patogenesi attraverso l'incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno che sostengono la condizione di stress ossidativo [148] e anche attraverso

l'attivazione del *pathway* amiloidogenico che culmina con la produzione e l'accumulo del peptide A β [146].

Nonostante sia stato dimostrato il diretto coinvolgimento dell'ipossia nella patogenesi della AD, non sono stati ancora chiariti tutti i meccanismi attraverso cui essa esplica la sua azione di danno. Lo scopo di questo studio è stato quello di contribuire a chiarire il ruolo patologico dell'ipossia nell'AD analizzando principalmente le alterazioni della funzionalità mitocondriale indotte dalla riduzione della disponibilità di ossigeno, in particolare nelle condizioni di esposizione delle cellule al peptide A β .

Sulla base di quanto riportato in letteratura, ovvero il coinvolgimento della disfunzione mitocondriale e la presenza di condizioni ipossiche a livello neuronale nei pazienti AD, è nata l'ipotesi di verificare se l'ipossia e il peptide A β possano agire in maniera sinergica nel determinare un'alterazione della funzionalità mitocondriale. Pertanto, l'obiettivo della prima parte del progetto di ricerca è stato quello di analizzare gli effetti dell'esposizione congiunta all'ipossia e al peptide A β sulla linea cellulare PC12.

Le PC12 sono cellule di feocromocitoma di ratto caratterizzate dalla capacità di rispondere in maniera reversibile al fattore di crescita neuronale (NGF). In seguito all'esposizione all'NGF, le PC12 arrestano la loro proliferazione ed emettono processi simili a quelli prodotti dai neuroni in coltura; quando lo stimolo dell'NGF viene rimosso, i processi simil-neuritici degenerano e la crescita cellulare riprende. Le PC12 sono inoltre in grado di secernere neurotrasmettitori come la dopamina e la noradrenalina. Per queste caratteristiche, le PC12 rappresentano un modello cellulare valido per studi di neurobiologia e neurochimica [183]. Inoltre, le cellule PC12 sono già state usate in altri lavori per lo studio degli effetti del peptide A β [184, 185].

Prima di procedere con lo studio degli effetti derivanti dal trattamento con A β e ipossia, abbiamo ritenuto opportuno identificare innanzitutto la pO $_2$ da utilizzare durante gli esperimenti e successivamente caratterizzare la risposta del nostro modello cellulare alla sola ipossia. Per identificare la pO $_2$ a cui condurre i nostri esperimenti abbiamo scelto l'attività della COX come parametro di riferimento. A tale scopo abbiamo incubato le cellule PC12 in presenza di due diverse pO $_2$, ovvero 1.5% (\approx 20 μ M) e 0.5% (\approx 5 μ M), considerate rispettivamente condizioni di ipossia moderata e spinta. Come atteso, essendo l'ossigeno un

substrato dell'enzima, abbiamo ottenuto una significativa riduzione dell'attività COX in ipossia. A pO_2 1.5% la COX risulta dimezzata rispetto al controllo, suggerendo che la concentrazione dell'ossigeno in queste condizioni sia vicino al valore della K_M ; mentre a pO_2 0.5% l'attività COX risulta ulteriormente ridotta, indicando che la concentrazione dell'ossigeno diventa invece fortemente limitante per l'enzima in questa condizione. Poiché l'ipossia è in grado di indurre l'attivazione del processo mitofagico, abbiamo misurato l'attività dell'enzima citrato sintasi, considerato un indice del contenuto di mitocondri. Nel nostro sistema cellulare, l'ipossia determina un lieve calo della massa mitocondriale che sembra inoltre essere indipendente dalla concentrazione di ossigeno. Essendo la COX un enzima mitocondriale, abbiamo poi normalizzato la sua attività su quella della citrato sintasi. Anche dopo la normalizzazione, il calo di attività COX indotto dall'ipossia viene confermato, indicando che tale riduzione è frutto di un'alterazione funzionale dell'enzima e non di una riduzione del contenuto dell'enzima stesso.

Secondo quanto detto riguardo al coefficiente di controllo di flusso, la riduzione dell'attività COX potrebbe influenzare il processo della fosforilazione ossidativa. Pertanto, abbiamo misurato la velocità della sintesi di ATP in presenza di condizioni ipossiche. Parallelamente al calo dell'attività COX, anche la sintesi di ATP risulta diminuita più a pO_2 0.5% che a pO_2 1.5%, probabilmente proprio a causa della forte riduzione dell'attività COX rilevata in ipossia. Avendo riscontrato questo effetto di inibizione della OXPHOS in ipossia, abbiamo anche misurato il contenuto intracellulare di ATP, il quale risulta significativamente ridotto in entrambe le condizioni ipossiche. Dal momento che l'entità del calo dei livelli di ATP è maggiore della riduzione della velocità di OXPHOS, si può ipotizzare che la riduzione di sintesi di ATP mitocondriale non sia il solo evento responsabile della deplezione di ATP in ipossia. Un altro fattore responsabile potrebbe essere il consumo di ATP da parte dell'ATP sintasi, che in ipossia idrolizza ATP per sostenere un adeguato potenziale di membrana [133]. L'ipossia determina quindi nel nostro sistema cellulare la riduzione della disponibilità energetica, evento caratterizzante del processo neurodegenerativo. Considerata la significativa riduzione dell'attività COX e della disponibilità di ATP dovuta all'esposizione a pO_2 0.5%, abbiamo scelto di condurre la sperimentazione successiva adottando come condizione di ipossia una pO_2 1.5%. Questo condizione di ipossia più moderata dovrebbe verosimilmente avvicinarsi a quella riscontrabile *in vivo* a livello neuronale.

Lo stress ossidativo rappresenta un'altra caratteristica distintiva del quadro neurodegenerativo. Pertanto, abbiamo verificato se il nostro sistema sperimentale mostrasse in ipossia un profilo ossidativo alterato. Il nostro modello è caratterizzato da un significativo incremento della quantità intracellulare di ROS indotto dall'esposizione all'ipossia. Le opinioni circa il comportamento delle ROS in ipossia sono discordanti [186]. Alcuni autori sostengono che l'ipossia determini una riduzione della quantità di ROS, dovuta essenzialmente alla ridotta disponibilità dell'ossigeno, substrato per la formazione delle ROS stesse. Di contro, altri autori sostengono che in ipossia si verifichi invece un aumento della produzione di ROS. L'ipossia determina la riduzione della velocità di trasporto degli elettroni attraverso i complessi della catena respiratoria che conferisce agli elettroni una maggiore tendenza a ridurre direttamente l'ossigeno, determinando così un aumento della produzione delle ROS a livello mitocondriale [112]. In accordo con la seconda ipotesi, nel nostro sistema cellulare abbiamo osservato un aumento della quantità di ROS generate in seguito all'esposizione in condizioni ipossiche.

L'aumento della produzione di ROS induce una risposta a livello intracellulare, attraverso la quale la cellula mette in atto una serie di meccanismi protettivi che hanno lo scopo di ridurre la quantità delle ROS stesse, limitando così il danno ossidativo. Il glutatione è il più potente antiossidante endogeno non enzimatico, la cui biosintesi è incrementata in presenza di una condizione di stress ossidativo [187]. In seguito all'esposizione in condizioni ipossiche le cellule PC12 hanno mostrato un aumento considerevole della quantità di GSH totale, probabilmente indotto dall'aumento dei livelli intracellulari di ROS. Anche la quantità di glutatione ossidato, prodotto durante la reazione di detossificazione dalle ROS, è risultata significativamente aumentata in ipossia. Gli incrementi sia del contenuto cellulare di GSH che dei livelli di glutatione ossidato possono essere quindi interpretati come un meccanismo attuato dalla cellula per far fronte alla condizione di stress ossidativo indotta dall'ipossia.

Un altro meccanismo di protezione dallo stress ossidativo coinvolge l'azione degli enzimi antiossidanti, che rimuovono cataliticamente l'eccesso di ROS. Nelle PC12 l'attività della glutatione perossidasi, enzima antiossidante che rimuove i perossidi mediante l'uso del glutatione come agente riducente, è risultata invariata in ipossia rispetto alla condizione normossica. Questo risultato, già riscontrato in studi *in vivo* [188] e apparentemente in contrasto con l'aumento dei livelli delle ROS, può essere spiegato ipotizzando che la GPX sia presente in quantità tali da riuscire a sopperire alla condizione di stress ossidativo indotto

dall'ipossia nel nostro modello cellulare. Diversamente si comporta invece la catalasi, enzima citosolico coinvolto nella degradazione del perossido di idrogeno, la cui attività è risultata invece aumentare in condizioni ipossiche, parallelamente all'incremento delle ROS indotto dall'ipossia.

Le cellule PC12 coltivate in condizioni ipossiche mostrano dunque due tipiche caratteristiche del processo neurodegenerativo: la riduzione della disponibilità energetica e la presenza di una condizione di stress ossidativo. La riduzione dell'attività COX, il calo della velocità OXPHOS e la deplezione dei livelli intracellulari di ATP sono responsabili del danno bioenergetico; l'aumento delle ROS e l'attivazione dei sistemi antiossidanti endogeni indicano invece la presenza di uno stato redox alterato. Le alterazioni funzionali indotte dall'ipossia nelle PC12 rendono il nostro sistema cellulare un modello sperimentale valido per studiare gli effetti tossici del peptide A β in condizioni di carenza di ossigeno.

Prima di iniziare lo studio dell'azione congiunta di ipossia e A β , abbiamo concluso questa prima fase della sperimentazione analizzando gli effetti di alcune molecole ad azione antiossidante e protettiva. In particolare, abbiamo concentrato la nostra attenzione su quattro composti che, per le loro proprietà, mostrano un potenziale terapeutico per il trattamento della AD: l'idebenone, l'oleato, la spermina, il trolox. Dopo aver individuato la concentrazione attiva per ciascuna molecola in esame, ne abbiamo valutato gli eventuali effetti protettivi sui parametri che sono risultati maggiormente compromessi dall'esposizione all'ipossia, ovvero i livelli intracellulari di ROS, l'attività COX, il contenuto di ATP. Tutte le molecole incluse nello studio sono in grado di contrastare l'incremento dei livelli intracellulari di ROS indotto dall'ipossia; l'idebenone e la spermina risultano particolarmente efficaci, mentre oleato e trolox mostrano un effetto più moderato. L'azione antiossidante di idebenone, spermina e trolox è da ascrivere alla loro capacità di *scavenging*, ovvero di reagire direttamente con le ROS rimuovendole ed eliminandone il potenziale tossico. L'oleato, che pure riduce la produzione delle ROS in ipossia, non è un antiossidante diretto. La sua azione protettiva nei confronti dello stress ossidativo può essere attribuita alla sua capacità di interagire con le membrane cellulari, migliorandone le proprietà di resistenza alla perossidazione lipidica.

Le molecole analizzate non hanno invece mostrato alcun effetto protettivo sui parametri bioenergetici, essendo incapaci di proteggere dal calo dell'attività COX o di preservare i livelli di ATP in ipossia. Questi risultati suggeriscono che, nelle nostre condizioni sperimentali di limitata esposizione temporale all'ambiente ipossico (24h), la riduzione dell'attività COX e la deplezione dei livelli di ATP non siano dovute al danno ossidativo correlato all'aumento delle ROS, ma siano rispettivamente un effetto diretto della ridotta concentrazione di ossigeno e dei meccanismi di adattamento alla condizione ipossica. Pertanto, composti dotati di proprietà antiossidanti dirette o indirette non riescono ad intervenire nelle prime fasi del danno ipossico sui parametri bioenergetici analizzati.

La caratterizzazione del sistema cellulare in ipossia ci ha consentito di dimostrare che le cellule PC12 coltivate per 24 h a pO_2 1.5% sono caratterizzate da una alterazione del profilo energetico e dello stato redox. La riduzione dell'attività della COX e della fosforilazione ossidativa indotte dall'ipossia contribuiscono al deficit energetico, mentre l'incremento delle ROS e l'attivazione dei sistemi di protezione sono un indice di uno stato ossidativo alterato. Queste alterazioni funzionali sono compatibili con un profilo di tipo neurodegenerativo e rendono il nostro sistema cellulare un modello utile per lo studio dell'azione congiunta di ipossia e β -amilode. Abbiamo pertanto proseguito con lo studio dell'azione del peptide A β da solo o in associazione con l'ipossia, definendo innanzitutto la concentrazione di peptide da utilizzare durante gli esperimenti. A questo scopo, abbiamo usato l'attività COX come parametro di riferimento così come abbiamo fatto per la definizione della pO_2 . Dopo aver incubato per 24h le cellule in presenza di concentrazioni crescenti di peptide A β (2.5 – 10 μ M), abbiamo osservato un calo statisticamente significativo dell'attività COX solo in presenza di A β 10 μ M e abbiamo perciò scelto di utilizzare questa concentrazione di peptide nei successivi esperimenti, evitando concentrazioni di A β più elevate o tempi di esposizione più prolungati che avrebbero potuto indurre fenomeni di aggregazione o accumulo extracellulare del peptide.

Il calo dell'attività COX indotta dalla A β in normossia è un risultato atteso, dal momento che il peptide A β inibisce la COX interagendo direttamente con il gruppo eme-a [83]. Questo risultato è in linea anche con quanto osservato in campioni autoptici di pazienti AD, per i quali è stata dimostrata una compromissione dell'attività COX sia a livello neuronale che periferico [84]. In condizioni ipossiche la A β induce un debole calo dell'attività COX,

mostrando dunque solo un lieve effetto additivo. L'azione dannosa del peptide, chiaramente riscontrata in normossia, diventa meno evidente in ipossia. Inoltre, la presenza di A β è associata a una moderata riduzione della massa mitocondriale in ipossia; pertanto, dopo la normalizzazione sulla citrato sintasi, il calo di attività COX correlato alla A β è confermato in normossia ma praticamente annullato in ipossia. Ciò potrebbe essere anche dovuto alla sostituzione della subunità COX4-1 con la subunità COX4-2 indotta da HIF-1 [135]. Non abbiamo evidenziato quindi per questo parametro l'effetto congiunto ipotizzato di ipossia e del peptide A β .

Abbiamo poi proseguito il nostro studio sugli effetti dell'esposizione delle cellule al peptide A β analizzando la velocità di sintesi di ATP NADH-dipendente e il contenuto intracellulare di ATP. Il peptide A β non ha mostrato alcun effetto sulla velocità di sintesi di ATP, né in normossia né in ipossia. È ipotizzabile che le condizioni di esposizione al peptide A β da noi adottate non siano sufficienti a determinare un effetto evidente sulla OXPHOS, che risulta dunque invariata. Il risultato di un mancato effetto del peptide A β sulla OXPHOS in ipossia correla con l'assenza dell'effetto congiunto di ipossia e A β osservato per l'attività COX; la mancanza di un effetto inibitorio di A β sembra invece in contrasto con quanto ottenuto per la COX in condizioni normossiche, dove abbiamo invece osservato un evidente calo dell'attività enzimatica indotto dal peptide. Tuttavia, un risultato simile è già stato osservato su un diverso sistema cellulare da Bosetti e collaboratori, i quali dimostrarono che in campioni autoptici di pazienti AD il significativo calo dell'attività COX in normossia non era associato alla riduzione della velocità di sintesi di ATP [84].

Nonostante non sia stata osservata alcuna conseguenza sulla velocità OXPHOS, il peptide A β ha invece mostrato un significativo effetto sul contenuto intracellulare di ATP, dal momento che il trattamento con peptide A β riduce i livelli di ATP sia in condizioni normossiche che in condizioni ipossiche. Questo risultato può essere spiegato considerando che il peptide A β è in grado di interferire anche con altri processi di produzione dell'energia. È stato dimostrato infatti che il peptide A β interferisce con l'*uptake* del glucosio e contestualmente inibisce enzimi della via glicolitica, contribuendo così alla riduzione della disponibilità energetica tipica dell'AD [82]. Il risultato più interessante consiste però nel fatto che ipossia e A β mostrano un effetto congiunto di tipo additivo, al quale è associata una riduzione considerevole del contenuto di ATP in grado di compromettere lo stato energetico totale del sistema cellulare.

L'ultimo parametro per il quale abbiamo valutato l'effetto del peptide A β è rappresentato dal contenuto intracellulare delle ROS. In condizioni sia normossiche che ipossiche il peptide A β induce nelle cellule PC12 un aumento del contenuto di ROS. Dal momento che nel nostro modello sperimentale il peptide A β non interferisce con la velocità di OXPPOS, è difficile collegare l'aumento delle ROS osservato ad un effetto del peptide a livello della catena di trasporto degli elettroni. È possibile invece ipotizzare che, nelle cellule PC12, l'incremento dei livelli delle ROS indotto dall'esposizione al peptide sia dovuto alla capacità della A β di indurre direttamente la generazione di specie radicaliche dell'ossigeno a livello citosolico [119]. Le ROS così generate danneggerebbero innanzitutto le membrane, innescando la reazione di perossidazione lipidica [22]. Anche per questo parametro il risultato più interessante è l'effetto additivo di ipossia e A β : l'incremento delle ROS indotto dalla sola ipossia si somma a quello indotto dal peptide A β , traducendosi in un considerevole aumento delle ROS intracellulari rispetto al controllo. Ad ulteriore conferma dell'effetto di potenziamento della generazione delle ROS indotto dai due fattori, vi sono anche i risultati ottenuti dopo il trattamento con molecole protettive delle cellule PC12 esposte contemporaneamente all'ipossia e al peptide A β . Le molecole protettive analizzate hanno mostrato la capacità di ridurre in vario modo l'aumento delle ROS indotto dalla sola ipossia. Quando le cellule sono esposte ad entrambi i fattori, le molecole mostrano una ridotta capacità antiossidante. In particolare, l'oleato, la spermina e il trolox perdono gran parte della loro protezione; solo l'idebenone conserva la sua capacità antiossidante, la quale risulta comunque ridotta rispetto a quella mostrata quando le cellule sono esposte alla sola ipossia. Le medesime concentrazioni di molecole protettive non sono quindi in grado di contrastare allo stesso modo l'aumento delle ROS indotto dall'azione congiunta di ipossia e A β , indicando un potenziamento del danno associato all'azione congiunta dei due fattori.

In conclusione, nel nostro sistema sperimentale il peptide A β è associato alla riduzione dell'attività COX in normossia, ma dagli esperimenti finora condotti non è emerso alcun effetto congiunto del peptide e dell'ipossia. La velocità di sintesi dell'ATP mitocondriale sembra inoltre non essere influenzata dalla presenza di A β nelle condizioni sperimentali adottate. Per questi due parametri non abbiamo quindi osservato l'effetto sinergico di ipossia e A β ipotizzato.

Abbiamo tuttavia ottenuto un risultato molto interessante per gli altri due parametri analizzati, ovvero i livelli di ATP e il contenuto delle ROS. L'ipossia e il peptide A β mostrano infatti un effetto congiunto di tipo additivo nel determinare la deplezione del contenuto intracellulare di ATP e l'incremento della produzione di ROS. I nostri risultati sostengono quindi l'ipotesi di un'azione combinata dei due fattori. Alla compromissione dello stato energetico cellulare dovuto alla deplezione dell'ATP fanno seguito una serie di alterazioni, quali la riduzione della disponibilità di neurotrasmettitori e la conseguente alterazione del potenziale di membrana, l'alterazione dell'omeostasi del calcio e rilascio di fattori apoptotici, risultando complessivamente in una minore capacità di tenere in vita la cellula. L'azione congiunta dei due fattori nel determinare l'incremento delle ROS sostiene gli eventi di danno a carico di lipidi, proteine e acidi nucleici e lo stato di stress ossidativo che ne consegue contribuisce alla progressione della patologia.

Parte II - Fibroblasti di pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer

I risultati ottenuti nella prima fase dello studio hanno messo in evidenza il potenziale effetto additivo dell'ipossia e del peptide A β . Questi due fattori contribuiscono congiuntamente alla riduzione della disponibilità energetica e all'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno. Tali fenomeni potrebbero sostenere il processo di morte cellulare che caratterizza la malattia di Alzheimer.

Per consolidare i risultati ottenuti nello studio condotto sulle cellule PC12, abbiamo introdotto un nuovo modello cellulare rappresentato da fibroblasti primari prelevati da pazienti affetti dalla malattia di Alzheimer. Nei fibroblasti inclusi nello studio sono state individuate mutazioni a carico dei geni codificanti per la proteina APP e per la presenilina (PSEN), le quali hanno come effetto finale l'aumento della produzione del peptide A β [14].

Siamo passati dunque da un modello sperimentale in cui il peptide A β veniva somministrato dall'esterno a un modello caratterizzato dalla produzione endogena del peptide neurotossico.

Il modello cellulare d'elezione per lo studio dell'AD è rappresentato da campioni autoptici prelevati dal tessuto cerebrale; tuttavia la limitazione nell'uso di campioni *post mortem* ha stimolato la ricerca di approcci alternativi per lo studio di questa patologia. Numerosi studi hanno dimostrato che i fibroblasti rappresentano un modello utile per lo studio dell'AD, grazie alla semplicità della procedura con cui vengono ottenuti e successivamente propagati [189]. I fibroblasti prelevati da pazienti AD sono caratterizzati da elevate concentrazioni di peptide A β secreto nei mezzi di coltura [190], dall'alterazione del metabolismo ossidativo [191] e da una condizione di sostenuto stress ossidativo [192]. Questo fenotipo li rende un modello cellulare adatto allo studio delle alterazioni funzionali correlate alla AD.

Il principale obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare il comportamento dei fibroblasti AD in risposta a condizioni ipossiche, analizzando in particolare le alterazioni della funzionalità mitocondriale. In questa seconda fase del nostro studio abbiamo scelto di adottare come condizione ipossica una pO₂ pari a 1% e di esporre le cellule all'ipossia per 72h. Da esperimenti condotti precedentemente nel nostro laboratorio su fibroblasti primari è emerso che pO₂ 1% può essere considerata una condizione di ipossia moderata per fibroblasti in coltura [193]. Inoltre, per i fibroblasti è necessario adottare un tempo di esposizione più prolungato all'ipossia rispetto a quello utilizzato per linee cellulari di origine tumorale (per esempio le cellule PC12) per poter osservare cambiamenti metabolici apprezzabili.

Dal momento che l'obiettivo di questo studio era di analizzare i principali parametri bioenergetici di fibroblasti di pazienti AD in risposta a condizioni di limitata disponibilità di ossigeno e poiché l'ipossia influenza primariamente la funzionalità mitocondriale, abbiamo innanzitutto analizzato l'attività dell'enzima citrato sintasi (CS).

L'attività CS nei fibroblasti AD non differisce da quella dei controlli, confermando un dato già riportato in letteratura [194]. Inoltre, sia i fibroblasti AD che i controlli rispondono allo stesso modo all'ipossia con un calo dell'attività della CS, indicando una riduzione della massa mitocondriale probabilmente correlata al processo di mitofagia indotto dall'ipossia [193]. Il

risultato è inoltre confermato dalle immagini di microscopia a fluorescenza ottenute per l'analisi del *network* mitocondriale. Dopo l'esposizione all'ipossia tutte le linee di fibroblasti contengono un numero inferiore di mitocondri e sia la quantità che la distribuzione di questi ultimi all'interno della cellula non differiscono significativamente tra fibroblasti AD e controlli.

La AD è caratterizzata da una alterazione di tutto il metabolismo energetico ed in particolar modo di quello mitocondriale [82]. È stato dimostrato che molte di queste alterazioni sono mediate direttamente dalla proteina A β [73], che si accumula a livello dei mitocondri determinando la riduzione della fosforilazione ossidativa, conseguente deplezione di ATP e, quindi, minore capacità di tenere in vita i neuroni. Per dimostrare se i fibroblasti AD inclusi nello studio sono caratterizzati da questo profilo energetico alterato, abbiamo misurato i livelli intracellulari di ATP. I fibroblasti AD mostrano rispetto ai controlli un contenuto di ATP significativamente ridotto già in normossia. Questo risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura e suggerisce che le mutazioni a carico dei geni APP o PSEN siano in grado, attraverso la iperproduzione di A β , di indurre alterazioni funzionali tali da compromettere il bilancio energetico della cellula. Similmente a quanto osservato per le cellule PC12, i fibroblasti controllo esposti all'ipossia sono caratterizzati da una riduzione dei livelli di ATP. Ciò che risulta particolarmente interessante è la risposta indotta dall'ipossia nei fibroblasti AD: il calo del contenuto di ATP intracellulare già presente in normossia risulta infatti potenziato dall'esposizione all'ipossia.

La ridotta disponibilità di ATP riscontrata nei fibroblasti AD può essere in parte spiegata dalla riduzione del consumo di glucosio. Abbiamo dimostrato che i fibroblasti AD sono caratterizzati da un ridotto consumo di glucosio in normossia. Questo risultato è in accordo con le evidenze che dimostrano nei soggetti AD un ridotto *uptake* del glucosio e una inibizione della via glicolitica [82]. Tutte le linee di fibroblasti mostrano in seguito all'esposizione all'ipossia un aumento del consumo del glucosio, fenomeno che, come spiegato nell'introduzione, rappresenta una conseguenza dei meccanismi di adattamento metabolico all'ipossia. Tuttavia, nei fibroblasti AD il consumo del glucosio in ipossia rimane comunque più basso rispetto a quello osservato nei controlli, contribuendo al deficit energetico che caratterizza le linee mutate esposte a condizioni ipossiche. Abbiamo inoltre misurato la produzione di lattato, ottenendo dati coerenti con quelli relativi al consumo di

glucosio. I fibroblasti AD mostrano infatti una riduzione della produzione di lattato rispetto ai controlli sia in normossia che in ipossia, dovuta alla ridotta disponibilità di glucosio a livello intracellulare; mentre in condizioni ipossiche la produzione di lattato aumenta per effetto dell'aumento del consumo di glucosio attraverso la glicolisi.

I fibroblasti AD sono dunque caratterizzati da una riduzione della disponibilità energetica e questa condizione risulta ancor più evidente quando le cellule sono esposte all'ipossia, nonostante i meccanismi di adattamento metabolico messi in atto in risposta alla riduzione della disponibilità di ossigeno.

Il peptide A β esplica parte delle sua azione tossica a livello mitocondriale: inibisce l'attività della COX, riduce la velocità della OXPHOS, altera le proprietà della membrana mitocondriale interna [80]. Il peptide A β è quindi in grado di compromettere complessivamente l'attività mitocondriale. Pertanto, abbiamo deciso di misurare il potenziale della membrana mitocondriale interna ($\Delta\psi_m$), considerato un indice della funzionalità del mitocondrio.

I fibroblasti AD mostrano un valore di $\Delta\psi_m$ significativamente più basso di quello misurato per i controlli già in normossia. Le mutazioni predisponenti all'aumento della produzione di peptide A β sembrano essere associate alla riduzione del $\Delta\psi_m$ e quindi alla alterazione di tutti i processi da esso dipendenti. Questo dato è in accordo con quanto riportato in letteratura. Come discusso nell'introduzione, il peptide A β è responsabile di una serie di eventi che determinano l'alterazione della funzionalità mitocondriale, che culmina con il collasso del potenziale di membrana e il rilascio di fattori proapoptotici [22].

Ancora una volta risulta potenzialmente interessante l'effetto dell'esposizione all'ipossia. Sia i fibroblasti AD che i controlli mostrano in ipossia un significativo calo della fluorescenza associata al $\Delta\psi_m$, probabilmente correlato alla riduzione della massa mitocondriale. Tuttavia, in condizioni ipossiche la riduzione del $\Delta\psi_m$ riportata in normossia per i fibroblasti AD rispetto ai controlli risulta essere ulteriormente accresciuta.

Il $\Delta\psi_m$ è coinvolto in almeno tre differenti processi: *i*) il trasporto dei metaboliti attraverso la membrana (acidi carbossilici, ADP, ATP, fosfato, calcio), *ii*) il trasporto delle proteine dal citosol all'interno del mitocondrio, *iii*) la sintesi dell'ATP catalizzata dall'ATP sintasi. Il considerevole calo del potenziale della membrana mitocondriale osservato nei fibroblasti AD esposti all'ipossia compromette i processi da esso dipendenti, contribuendo quindi alla disfunzione mitocondriale caratterizzante la AD.

Lo stress ossidativo rappresenta uno dei principali meccanismi coinvolti nell'insorgenza e nella progressione della malattia di Alzheimer. I neuroni dei pazienti AD sono caratterizzati da un aumento del contenuto di ROS e una compromissione dei sistemi di difesa antiossidante, fenomeni che contribuiscono al danno cellulare e al processo neurodegenerativo [120, 122].

Diversamente da quanto atteso, i fibroblasti AD mostrano in normossia la stessa quantità di ROS osservata nei controlli; tuttavia, essi rispondono in maniera differente all'ipossia. L'esposizione a condizioni ipossiche induce nei fibroblasti controllo una riduzione dei livelli di ROS. Questo risultato è in apparente contraddizione con il comportamento delle cellule PC12, per le quali abbiamo osservato un aumento delle ROS prodotte dopo esposizione all'ipossia. Questa differente risposta all'ipossia nella produzione di ROS può essere spiegata considerando il diverso tempo di incubazione in condizioni ipossiche adottato per i due tipi cellulari, ovvero 24h per le PC12 e 72h per i fibroblasti. Come descritto nell'introduzione, quando le cellule sono esposte all'ipossia, rispondono aumentando la produzione di ROS; ma se esse vengono mantenute in ipossia per un tempo prolungato (ipossia cronica), riducono i livelli di ROS per effetto dei meccanismi di adattamento metabolico indotti dall'ipossia stessa [195].

Nel nostro caso il ridotto contenuto di ROS dei fibroblasti controllo in ipossia potrebbe essere dovuto alla riduzione del contenuto di mitocondri, che rappresentano la principale sede di produzione delle ROS. Come i controlli così anche i fibroblasti AD sono caratterizzati dalla riduzione dei livelli di ROS dopo esposizione all'ipossia, ma tale calo risulta più limitato rispetto a quello osservato nei fibroblasti controllo. In ipossia, quindi, i fibroblasti AD mostrano un contenuto di ROS superiore a quello dei controlli suggerendo l'esistenza di una condizione di stress ossidativo dovuto all'aumento della produzione di ROS e/o alla ridotta efficienza dei sistemi antiossidanti. Va inoltre ricordato che l'ipossia potenzia la via amiloidogena aumentando la produzione del peptide A β , diretto induttore della produzione di ROS. Questo fattore potrebbe ulteriormente contribuire all'aumento dei livelli di ROS osservato nei fibroblasti AD in ipossia.

Analizzando i risultati ottenuti è possibile osservare che i fibroblasti con mutazione di APP e quelli con mutazioni in PSEN mostrano un comportamento simile in normossia e rispondono in maniera analoga all'ipossia. Questo risultato suggerisce che il danno metabolico

evidenziato non sia correlato al tipo di mutazione, quanto al fatto che la presenza della mutazione aumenta la produzione del peptide A β , al quale possono essere almeno in parte attribuite le alterazioni dei parametri analizzati.

Conclusioni

I risultati finora ottenuti suggeriscono che la presenza di mutazioni predisponenti ad un fenotipo AD siano in grado di determinare in fibroblasti primari un danno bioenergetico e ossidativo. Il danno bioenergetico si manifesta attraverso la riduzione della disponibilità energetica della cellula e la riduzione del potenziale della membrana mitocondriale, mentre quello ossidativo si manifesta con l'incremento dei livelli di ROS. Ciò che risulta interessante è che le alterazioni bioenergetiche riscontrate in normossia risultano ulteriormente potenziate quando i fibroblasti sono coltivati in ipossia, mentre lo stato di stress ossidativo viene messo in evidenza solo in condizioni ipossiche.

Questi risultati sono in linea con quelli da noi ottenuti sulle cellule PC12, nelle quali abbiamo osservato un potenziamento dei fenomeni di deplezione dell'ATP e di generazione delle ROS indotti dal peptide A β quando anche l'ipossia era presente come fonte di danno cellulare, ipotizzando per i due fattori un effetto congiunto di tipo additivo.

Il ruolo patologico dell'ipossia nella AD è stato ampiamente dimostrato e sembra inoltre che l'ipossia partecipi a più meccanismi contemporaneamente [152]. Recentemente è stato documentato il suo coinvolgimento nella promozione della via amiloidogena e nel potenziamento del processo di iperfosforilazione della proteina tau, fenomeni che contribuiscono rispettivamente alla formazione delle placche neuritiche e degli ammassi neurofibrillari. È ormai ampiamente condivisa anche l'idea che l'ipoperfusione neuronale sia associata all'induzione di una condizione di stress ossidativo che a lungo andare attiva il processo di morte neuronale, la cui manifestazione clinica è rappresentata nell'AD dal progressivo declino delle funzioni cognitive. Tuttavia, non sono stati ancora caratterizzati tutti i meccanismi attraverso i quali l'ipossia partecipa alla patogenesi della malattia di Alzheimer.

Sulla base dei risultati finora conseguiti si può ipotizzare che uno dei meccanismi attraverso cui l'ipossia esplica la sua azione di danno nella AD, possa essere dovuto alla capacità di potenziare ulteriormente le alterazioni della funzionalità mitocondriale. Quando la compromissione della funzionalità mitocondriale raggiunge una soglia critica, gli effetti di tale alterazione si manifestano a livello fenotipico [196], dando luogo al fenomeno di disfunzione neuronale e al conseguente declino delle funzioni cognitive tipico della AD. L'ipossia, alterando la funzione mitocondriale, potrebbe contribuire al raggiungimento e al superamento di questa soglia di tollerabilità, promuovendo fortemente i processi di danno cellulare che sostengono l'insorgenza e la progressione della malattia di Alzheimer.

Bibliografia

- [1] Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer Disease. *Dis Mon* 2010;56:484-546.
- [2] Small GW, Rabins PV, Barry PP, et al. Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *JAMA* 1997;278:1363-71.
- [3] Fratiglioni L, De Ronchi D, Aguero-Torres H. Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging* 1999;15:365-75.
- [4] Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA, et al. Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA* 1995;273:1354-9.
- [5] Zhu CW, Sano M. Economic considerations in the management of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2006;1:143-54.
- [6] Alzheimer's disease – Facts and figures. www.alz.org/downloads/facts_figures_2013.pdf
- [7] Alzheimer's society. The progression of Alzheimer Disease and other dementias. <http://www.alzheimers.org.uk/site/index.php>
- [8] Wilcock GK, Esiri MM. Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J Neurol Sci* 1982;56:343-56
- [9] Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-59
- [10] Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci US A* 1986;83(11):4040-3.
- [11] Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(11):4044-8.
- [12] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y., Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(13):4913-7.
- [13] Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL. β -Amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110–135 kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7341–7345.
- [14] Weidemann A, Konig G, Bunke D. Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989;57:115–126.
- [15] Hung AY & Selkoe DJ. Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of β -amyloid precursor protein. *EMBO J* 1994;13:534–542.

-
- [16] Haass C, Hung AY, & Selkoe DJ. Processing of β -amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors a localization in internal vesicles over constitutive secretion. *J Neurosci* 1991 11: 3783–3793.
- [17] Rosen DR, Martin-Morris L, Luo L, White K. A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human b-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2478-2482.
- [18] Vetrivel KS, Thiakaran G. Amyloidogenic processing of β -amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 2006;66(Suppl 1):S69-S73.
- [19] Walter J, Capell A, Hung AY. Ectodomain phosphorylation of b-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* 1997;272: 1896–1903.
- [20] Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Bestie EC. The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* 1990;265: 4492–4497.
- [21] Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, AND Beyreuther K. Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989;57:115–126.
- [22] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 2010;362(4):329-344.
- [23] Selkoe D. Alzheimer's Disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological review* 2001;81(2):741-766.
- [24] Mattson M, Cheng B, Culwell A, Esch F, Lieberburg I, Rydel R. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron* 1993;10:243–254.
- [25] Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB. Secreted form of amyloid β protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 1989;58:615–622.
- [26] Sinha S, Dovey HF, Seubert P, Ward PJ, Balcher RW, Blaber M, Bradshaw RA, Arici M, Mobley WC, Lieberburg I. The protease inhibitory properties of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1990;265:8983–8985.
- [27] Smith RP, Higuchi DA, Broze GJ JR. Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 1990;248:1126–1128.
- [28] Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G. The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 1989;3:689–694.
- [29] Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, Selkoe DJ. Cell-surface β -amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci* 1995;15:2157–2167.
- [30] Lammich S, Kojro E, Postina R, et al. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;96:3922–3927.

-
- [31] Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 1998;273:27765–27767.
- [32] Pruessmeyer J, Ludwig A. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:164-174.
- [33] Endres K, Fahrenholz F. Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity. *Exp Brain Res* 2012;217:343–352.
- [34] Postina R, Schroeder A, Dewachter I, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2004;113:1456–1464.
- [35] Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992 359, 322–325.
- [36] Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, et al. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino-terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* 1993 361, 260–263.
- [37] Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer disease. *J Mol Neurosci* 2004;23:105-114.
- [38] Cook DG, Forman M, Sung JC. Alzheimer's $A\beta(1-42)$ is generated in the endoplasmic reticulum7intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* 1997;3:1021-1023.
- [39] Vetriell KS, Cheng H, Lin W. Association of γ -secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 2004;279:44945-44954.
- [40] Chyung JH, Raper DM, Selkoe DJ. Γ -secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem* 2005;280:4383-4392.
- [41] Podlisny MB, Citron M, Amarante P, et al. Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 1997;3:325–337.
- [42] Capell A, Grumberg J, Pesold B, et al. The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100- to 150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem* 1998;273:3205–3211.
- [43] Baumeister R, Leimer U, Zweckbronner I, et al. Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct* 1997;1(2):149-159.
- [44] Georgakopoulos A, Marambaud P, Efthimiopoulos S, et al. Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. *Mol Cell* 1999;4(6):893-902.

-
- [45] Kaether C, Haass C, Steiner H. Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* 2006;3(4-5):275-83.
- [46] Zhou S, Zhou H, Walian PJ, et al. The discovery and role of CD147 as a subunit of gamma-secretase complex. *Drug News Perspect* 2006;19(3):133-8.
- [47] Wolfe MS. Structure, Mechanism and Inhibition of γ -Secretase and Presenilin-Like Proteases. *Biol Chem* 2010;391(8):839-847.
- [48] Xia W, Zhang J, Kholodenko D, et al. Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem* 1997;272(12):7977-82.
- [49] Naruse S, Thinakaran G, Luo JJ, et al. Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 1998;21(5):1213-21.
- [50] Wolfe MS. Toward the structure of presenilin/ γ -secretase and presenilin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013;1828:2886-2897.
- [51] Gearing M, Mori H, Mirra SS. A β -peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1996;39:395-399.
- [52] Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Nature* 1993;261(5123):921-3.
- [53] Saunders AM, Schmechel K, Breitner JC, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 1993;342(8873):710-1.
- [54] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991;349(6311):704-6.
- [55] Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995;375(6534):754-60.
- [56] Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995;269(5226):973-7.
- [57] <http://www.molgen.vib-a.be/ADMutations/default.cfm?MT=1&ML=1&Page=MutByGene>
- [58] Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996;2(8):864-70.
- [59] Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996;17(5):1005-13.
- [60] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256:2.
- [61] Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005;120:545-55.

-
- [62] Kaye R, Head E, Thompson JL et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003;300:486-9.
- [63] Selkoe JL. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002;283:32176-87.
- [64] Hsieh H, Boehm J, Sato C, et al. AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 2006;52:831-43.
- [65] Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, et al. β -amyloid binds to α 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity: implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 200;275:5626-37.
- [66] Connor B, Young D, Yan Q, et al. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;49:71-81.
- [67] Heneka MT & O'Banion MK. Inflammatory process in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunology* 2007;184:69-91.
- [68] Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:289-305.
- [69] Swerdlow RH. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2007;2:347-359.
- [70] Swerdlow RH, Khan SM. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 2004;63:8-20.
- [71] Simpkins JW, Dykens JA. Mitochondrial mechanism of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev* 2008;57:421-30.
- [72] Moreira PI, Duarte AI, Santos MS. An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J Alzheimers disease* 2009;16:741-761.
- [73] Tillement L, Lecanu L, Papanicolaou V. Alzheimer's disease: effects of B-amyloid on mitochondria. *Mitochondrion* 2011;11(1):13-21.
- [74] Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* 2003;161:41-54.
- [75] Devi L, Prabhu BM, Galati DF, et al. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 2006;26:9057-68.
- [76] Muirhead KE, Borger E, Aitken L, et al. The consequences of mitochondrial amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Biochem J* 2010;426:255-70.
- [77] Manczak M, Anekonda TS, Henson E, et al. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 2006;15:1437-49.
- [78] Caspersen C, Wang N, Yao J, et al. Mitochondrial A β : a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J* 2005;19:2040-1.

-
- [79] Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, et al. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13145–50.
- [80] Aleari AM, Benerd G, Augereau O, et al. Gradual alteration of mitochondrial structure and function by β .amyloid: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and citochrome c release. *J Bioenergetics and biomembranes* 2005;37(4):207-225.
- [81] Moreira PI, Santos MS, Moreno A, et al. Effect of amyloid beta-peptide on permeability transition pore: comparative study. *J Neurosci Res* 2002;69:257-267.
- [82] Ferreira IL, Resende R, Ferreiro E, et al. Multiple defects in Energy metabolism in Alzheimer's disease. *Current Drug Target* 2010;11(10):1-11.
- [83] Atamna H, Boyle K. Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3381-3386.
- [84] Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, et al. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2002; 23(3):371-6.
- [85] Parker WD, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 1990;40(8):1302-3.
- [86] Cardoso SM, Proença MT, Santos S, et al. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiology of Aging* 2004;25(1):105-10.
- [87] Curti D, Rognoni F, Gasparini L, et al. Oxidative metabolism in cultured fibroblasts derived from sporadic Alzheimer's disease (AD) patients. *Neuroscience Letters*. 1997;236(1):13-6.
- [88] Valla J, Schneider L, Niedzielko T, et al. Impaired platelet mitochondrial activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Mitochondrion* 2006;6(6):323-30.
- [89] Alexeyev MF, Ledoux SP, Wilson GL. Mitochondrial DNA and aging. *Clin Sci* 2004;107:355-364.
- [90] Massad CA, Amin SK, Hu I, et al. Mitochondrial superoxide dismutase contributes to blood flow and axonal transport deficits in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Plos One* 2010; 5:e10561.
- [91] Murakami Y, Ohsawa I, Kasahara T. Cytoprotective role of mitochondrial amyloid beta peptide-binding dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde. *Neurobiol Aging* 2009;30:325-329.
- [92] LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease. *Ney Rev Neurosci* 2002;3:862-872.
- [93] Ferreiro E, Oliveira CR, Preira CM. The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol Dis* 2008;30:331-342.

-
- [94] Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, et al. Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium. *J Biol Chem* 2006;281:27916-23.
- [95] Pierrot N, Ghisdal P, Caumont AS, Octave JN. Intraneuronal amyloid-beta1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J Neurochem* 2004;88:1140-50.
- [96] Nelson O, Tu H, Lei T, et al. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. *J Clin Invest* 2007;117:1230-9.
- [97] Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor - still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 1995; 18:57-8.
- [98] Mancuso M, Coppedè F, Migliore L, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimer Dis* 2006;10:59-73.
- [99] Wang J, Xiong S, Xie C et al. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2005;93:953-62.
- [100] Grazina M, Pratas J, Silva F et al. Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA mutations. *Genes Brain Behav* 2006;5(Suppl 2):92-107.
- [101] Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, et al. Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics*. 1994;23:471-6.
- [102] Davis RE, Miller S, Herrnstadt C, et al. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer sidease. *Proc Nat Acad Sci* 1997;94(9):4526-31.
- [103] Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, et al. The importance of dendritic mitochondria in morphogenesis and plasticità of spines and synapse. *Cell* 2004;19:873-887.
- [104] Su B, Wang X, Bonda D, et al. Abnormal mitochondrial dynamics – A therapeutic target for Alzheimer's disease? *Mol Neurobiol* 2010; 41(2-3):87-96.
- [105] Wang X, Su B, Siedlak SL, et al. Amyloid –beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion protein. *Proc Nat Acad Sci* 2008;105:19318-23.
- [106] Cho DH, Nakamura T, Fang J, et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 2009;324:102-5.
- [107] Wang X, Su B, Lee HG, et al. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2009;29:9090-9103.
- [108] Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7124-7128.
- [109] Patten DA, Germain M, Melissa AK, Slack RS. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimer Dis* 2010;20:S357-S367.
- [110] Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10(2):389-406.

-
- [111] Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 1999;77(5):658-666.
- [112] Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and metabolism* 2009;20(7):332-340.
- [113] Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 2005;126:365–79.
- [114] Mates JM, Perez-Gomez C and De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595–603.
- [115] Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular Antioxidants: from chimica to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37:949–62.
- [116] Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16:577–86.
- [117] Dröge W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exper Geront* 2002;37:1333–45.
- [118] Moreira PI, Honda K, Liu Q, et al. Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology. *Curr Alzheimer Res* 2005;2:403-8.
- [119] Marlatt M, Lee Hyoung-gon, Perry G, et al. Sources and mechanism of cytoplasmic oxidative damage in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp* 2004;64:81-87.
- [120] Su B, Wang X, Nunomura A, et al. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008;5(6):525-532.
- [121] Reynolds WF, Rhee J, Maciejewski D, et al. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1999;155:31-41.
- [122] Zhu X, Su B, Wang X, et al. Causes of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:2202-2210.
- [123] De la Torre JC. Critically attained threshold of cerebral hypofesion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's psthogenesis. *Neurobiol Aging* 2000;21:331-342.
- [124] Meyer JS, Rauch GM, Rauch RA, et al. Cardiovascular and other risk factors for Alzheimer's disease and vascular dementia. *Ann NY Acad Sci* 2000;903:411–23.
- [125] Kuller LH, Lopez OL, Newman A, et al. Risk factors for dementia in the cardiovascular health cognition study. *Neuroepidemiology* 2003;22(1):13–22.
- [126] Wellington CL. Cholesterol at the crossroads: Alzheimer's disease and lipid metabolism. *Clin Genet* 2004;66:1-16.

-
- [127] Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 2003;6:345-351.
- [128] Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm* 2002; 109(5-6):813–36.
- [129] Attems J, Lintner F, Jellinger KA. Amyloid b peptide 1–42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 2004;107(4):283–91.
- [130] Stewart PA, Hayakawa K, Akers MA, et al. A morphometric study of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Lab Invest* 1992;67:734-742.
- [131] de la Torre JC. Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* 2002;33:1152-1162.
- [132] Roy S, Rauk A. Alzheimer's disease and the 'ABSENT' hypothesis: mechanism for amyloid β endothelial and neuronal toxicity. *Medical Hypotheses* 2005;65:123–137.
- [133] Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 2010;1797:1171-1177.
- [134] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-5454.
- [135] Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J* 2007;405:1-9.
- [136] Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:C385-C393.
- [137] Chan SY, Zheng YY, Hermann C, et al. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly protein ISCU1/2. *Cell Metab* 2009;10:273-284.
- [138] Yung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* 2000;86:319-325.
- [139] Zhang H, Borsh-Marce LA, Shimoda YS, et al. Mitochondrial autophagy is a HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008;283:10892-10903.
- [140] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1813(7):1263-8.
- [141] Mazza M, Marano G, Traversi G, Bria P, Mazza S. Primary cerebral blood flow deficiency and Alzheimer's disease: shadows and lights. *J Alzheimers Dis* 2011; 23(3):375-389.
- [142] Ukraintseva S, Sloan F, Arbeevev K, Yashin A. Increasing rates of dementia at time of declining mortality from stroke. *Stroke* 2006; 37:1155-1159.

-
- [143] Kalaria RN. The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21:321-330.
- [144] Atkinson L, Boyle JP, Pearson HA, Peers C. Chronic hypoxia inhibits Na⁺/Ca²⁺ exchanger expression in cortical astrocytes. *Neuroreport* 2006;17:649-652.
- [145] Sun X, He G, Qing H, et al. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2006;103(49):18727-32.
- [146] Zhung X, Zhou K, Wang R, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and β -amyloid generation. *J Biol Chem* 2007;282(15):10873-10880.
- [147] Li L, Zhang X, Yang D, et al. Hypoxia increases A β generation by altering β - and γ -cleavage of APP. *Neurobiol Aging* 2009;30(7):1091-1098.
- [148] Guglielmotto M, Tamagno E, Danni O. Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. *Scientific World Journal* 2009;9:781-791.
- [149] Guglielmotto M, Aragno M, Autelli R, et al. The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF-1 α . *J Neurochem* 2009;108:1045-1056.
- [150] Shi J, Yang SH, Stubbley L, et al. Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model. *Brain Res* 2000; 853(1):1-4.
- [151] Nik SHM, Wilson L, Newman M, Croft K, Mori TA, Musgrave I, Lardelli M. The BACE1-PSEN-A β PP regulatory axis has an ancient role in response to low oxygen/oxidative stress. *J Alzheimer Dis* 2012; 28:515-530.
- [152] Zhang X, Le W. The pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2010;223:299-303.
- [153] Wang D, Dickson DW, Malter JS. β -Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006, Article ID 58406.
- [154] Nalivaeva NN, Fisk L, Kochkina EG, et al. Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzyme. *Ann NY Acad Sci* 2004;1035:21-33.
- [155] Chen GJ, Lahousse SA, Caggiano NL. Transient hypoxia causes Alzheimer-type molecular and biochemical abnormalities in cortical neurons: potential strategies for neuroprotection. *J Alzheimer Dis* 2003;5:209-228.
- [156] Landreth G, Jiang Q, Mandrekar S, Heneka M. PPAR γ agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *neurotherapeutics* 2008;5:481-489.
- [157] Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, et al. Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial A β . *Neuron* 2008;59:43-55.
- [158] Ankarcrona M, Mangialasche F, Winblad B. Rethinking Alzheimer's disease therapy: are mitochondria the key? *J Alzheimer Dis* 2010;10:S579-S590.

-
- [159] Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, et al. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:915-919.
- [160] Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato MA, Domenicotti C. Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 2007;28:591-606.
- [161] Isaac MG, Quinn R, Tabet N. Vitamin E for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev* 2008, CD002854.
- [162] Yang X, Yang Y, Li G, et al. Coenzyme Q10 attenuates beta-amyloid pathology in the aged transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation. *J Mol Neurosci* 2008;34:165-171.
- [163] No Authors listed. Idebenone – Monograph. *Altern Rev Med* 2001;6(1):83-6.
- [164] Massaro M, Carluccio MA, Paolicchi A, et al. Mechanisms for reduction of endothelial activation by oleate: inhibition of nuclear factor-kappaB through antioxidant effects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;67(2-3):175-81.
- [165] Massaro M, Basta G, Lazzarini G, et al. Quenching of intracellular ROS generation as a mechanism for oleate-induced reduction of endothelial activation and early atherogenesis. *Thromb Haemost* 2002;88:335-344.
- [166] Amtul Z, Westway D, Cecchetto DF, Rozmahel RF. Oleic acid ameliorates amyloidosis in cellular and mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 2011; 21:321-329.
- [167] Marton LJ, Pegg AE. Polyamines as target for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:55-91.
- [168] Solaini G, Tadolini B. Spermine binding to submitochondrial particles and activation of adenosine triphosphates. *Biochem J* 1984; 218:495-499.
- [169] Solaini G. Spermine antagonizes the binding of adriamycin to the inner membrane of heart mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:791-798.
- [170] Toninello A, Salvi M, Mondovi B. Interaction of biologically active amines with mitochondria and their role in the mitochondrial-mediated apoptosis. *Curr Med Chem* 2004;11:2349-2374.
- [171] Clarkson AN, Liu H, Pearson L, Kapoor M, Harrison JC, Sammut IA, Jackson DM, Appleton I. Neuroprotective effects of spermine following hypoxia-ischemia-induced brain damage: a mechanistic study. *FASEB J* 2004; 10.1096/fj.03-1203fje.
- [172] Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999;13:1145-1155.
- [173] Mangialasche F, Kivipelto M, Mecocci P, et al. High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age. *J Alzheimers Dis* 2010;20(4):1029-37.
- [174] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.

-
- [175] Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 1996; 264:484-509.
- [176] Baracca A, Sgarbi G, Mattiazzi M, Casalena G, Pagnotta E, Valentino ML, Moggio M, Lenaz G, Carelli V, Solaini G. Biochemical phenotypes associated with mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim and Biophys Acta* 2007; 1797:913-919.
- [177] Vergani L, Floreani M, Russell A, Ceccon M, Napoli E, Cabrelle A, Valente L, Bragantini F, Leger B, Dabbeni-Sala F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA depleted cell lines. *Eur J Biochem* 2004; 271:3646-3656.
- [178] Sgarbi G, Baracca A, Lenaz G, Valentino LM, Carelli V, Solaini G. Inefficient coupling between proton transport and ATP synthesis may be the pathogenic mechanism for NARP and Leigh syndrome resulting from the T8993G mutation in mtDNA. *Biochem J* 2006; 395:493-500.
- [179] Maruszak A, Zekanowsky C. Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. *Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry* 2011;35:320-330.
- [180] Rossignol R, Letellier T, Malgat M, et al. Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem* 2000;347:45-53.
- [181] Villani G, Attardi G. In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in human cells. *Free Rad Biol Med* 2000;29:202-210.
- [182] Wiedemann FR, Kunz WS. Oxygen dependence of flux control of cytochrome c oxidase – implications for mitochondrial diseases. *FEBS Lett* 1998;422:33-35.
- [183] Greene L, Tischler S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976;73(7):2424–8.
- [184] Oh Y, Young Kim E, Kim Y, et al. Neuroprotective effects of overexpressed cyclophilin B against A β -induced neurotoxicity in PC12 cells. *Free Radical Biology & Medicine* 2011;51:905–920.
- [185] Li L, Li W, Jung S, et al. Protective effects of decursin and decursinol angelate against amyloid β -protein-induced oxidative stress in PC12 cell line. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011;75(3):434-442.
- [186] Chandel NS, Scott Budiger GR. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Rad Biol Med* 2007;42:165-174.
- [187] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009;30(1-2):42–59.
- [188] Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, et al. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J Hyperten* 2004; 22(10):2025-2033.
- [189] Gibson G, Martins R, Blass J et al. Altered oxidation and signal transduction systems in fibroblasts from Alzheimer's patients. *Life Sciences* 1996;59:477-489.

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

[191] Curti D, Rognoni F, Gasparini L et al. Oxidative metabolism in cultured fibroblasts derived from sporadic Alzheimer's disease (AD) patients. *Neuroscience Letters* 1997;236:13-13.

[192] Ramamoorthy M, Sykora P, Scheibye-Knudsen M et al. Sporadic Alzheimer disease fibroblasts display an oxidative stress phenotype. *Free Radical Biol Med* 2012;53:1371-1380.

[193] Baracca A, Sgarbi G, Padula A, Solaini G. Glucose plays a main role in human fibroblasts adaptation to hypoxia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013;45:1356-1365.

[194] Mutisya AM, Bowling AC, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1994;63:2179-2184.

[195] Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177-185.

[196] Rossignol R, Faustin B, Rocher C, et al. Mitochondrial Threshold Effects. *Biochem J* 2003;370:751-762.