



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

---

Dipartimento di Scienze della Vita

## XXVI CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE E SCIENZE COGNITIVE

Indirizzo: Neurobiologia

### CORRELATI ANATOMICI, NEUROCHIMICI E FUNZIONALI DI EVENTI NEURODEGENERATIVI NEL RATTO

Settore Scientifico-Disciplinare: BIO-09

DOTTORANDA:

Margherita Riggi

COORDINATORE DELLA SCUOLA:

Chiar.mo Prof. Piero Paolo Battaglini

SUPERVISORE:

Chiar.mo Prof. Giampiero Leanza

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

*“Si deve incominciare a perdere la memoria,  
anche solo brandelli di ricordi,  
per capire che in essa consiste la nostra vita.  
Senza memoria la vita non è vita.  
La nostra memoria è la nostra coerenza,  
la nostra ragione,  
il nostro sentimento,  
persino il nostro agire.  
Senza di essa non siamo nulla.”*

*(Luis Buñuel)*

# Indice

<b>INDICE.....</b>	<b>1</b>
<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
1.1 LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE.....	7
1.1.1 <i>Aspetti in comune tra AD e PD.....</i>	8
1.1.1.1 <i>LA DEMENZA.....</i>	8
1.1.1.2 <i>LE PROTEINOPATIE.....</i>	9
1.1.1.3 <i>LA DEGENERAZIONE DEL LOCUS COERULEUS.....</i>	17
1.1.2 <i>La malattia di Alzheimer.....</i>	18
1.1.2.1 <i>FISIOPATOLOGIA.....</i>	18
1.1.2.2 <i>MODELLI ANIMALI DI AD.....</i>	26
1.1.2.3 <i>APPROCCI TERAPEUTICI.....</i>	30
1.1.3 <i>La malattia di Parkinson.....</i>	31
1.1.3.1 <i>FISIOPATOLOGIA.....</i>	31
1.1.3.2 <i>MODELLI ANIMALI DI PD.....</i>	34
1.1.3.3 <i>APPROCCI TERAPEUTICI.....</i>	37
1.2 IL SUBSTRATO ANATOMICO DELLA MEMORIA.....	38
1.2.1 <i>L'ippocampo.....</i>	39
1.2.2 <i>La corteccia prefrontale.....</i>	40
1.2.3 <i>I sistemi di neuromodulazione presi in esame.....</i>	41
1.2.3.1 <i>IL SISTEMA COLINERGICO DEL PROSENCEFALO DI BASE (BF).....</i>	41
1.2.3.2 <i>IL SISTEMA DOPAMINERGICO DELL'AREA TEGMENTALE VENTRALE (VTA).....</i>	43
1.2.3.3 <i>IL SISTEMA NORADRENERGICO DEL LOCUS COERULEUS (LC).....</i>	46
<b>2. SCOPI DELLA TESI.....</b>	<b>51</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>53</b>
3.1 ANIMALI E CONDIZIONI DI ALLEVAMENTO.....	53
3.2 DESING SPERIMENTALE.....	53
3.2.1 <i>Disfunzione della regolazione monoaminergica nel ratto.....</i>	54

3.2.2 Effetti neuropatologici indotti da deplezione colinergica ed infusione ippocampale di beta-amiloide pre-aggregata nel ratto.....	55
3.3 SOSTANZE.....	56
3.3.1 Immunotossine.....	56
3.3.1.1 192-IgG-saporina.....	56
3.3.1.2 anti-DBH-saporina.....	57
3.3.2 Neurotossine.....	57
3.3.2.1 6-idrossidopamina.....	57
3.3.3 Beta-amiloide 25-35 pre-aggregata.....	57
3.3.4 Altre sostanze utilizzate.....	57
3.4 PROCEDURE IN VIVO.....	58
3.4.1 Procedure di microchirurgia.....	58
3.4.1.1 LESIONI NEONATALI.....	58
3.4.1.2 LESIONI IN ADULTO.....	59
3.4.2 Test comportamentali.....	62
3.4.2.1 IL MORRIS WATER MAZE.....	63
3.4.2.2 LO SPATIAL PROBE TRIAL.....	64
3.4.2.3 IL RADIAL ARM WATER MAZE.....	65
3.5 PROCEDURE EX VIVO.....	66
3.5.1 Sacrifici e processamento dei tessuti.....	66
3.5.2 Procedure istologiche.....	67
3.5.2.1 COLORAZIONE ISTOCHIMICA PER LA RILEVAZIONE DELLE FIBRE AChE-POSITIVE.....	67
3.5.2.2 COLORAZIONE DI NISSL CON CRESIL VIOLETTO.....	67
3.5.2.3 IMMUNOISTOCHIMICA.....	68
3.5.3 Analisi microscopiche.....	69
3.5.4 Analisi con Western Blot.....	69
3.5.4.1 PREPARAZIONE DEI TESSUTI.....	70
3.5.4.2 SEPARAZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE ELETTROFORESI SU SDS-PAGE....	70
3.5.4.3 BLOTTING IN CAMERA DI TRASFERIMENTO.....	71
3.5.4.4 RICONOSCIMENTO DEGLI ANTIGENI E SVILUPPO DELLE LASTRE.....	71
3.5.4.5 ANALISI DENSITOMETRICHE.....	72

3.5.5 <i>Analisi statistiche</i> .....	72
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>73</b>
4.1 DISFUNZIONE DELLA REGOLAZIONE MONOAMINERGICA NEL RATTO.....	73
4.1.1 <i>Analisi funzionali</i> .....	73
4.1.1.1 <i>REFERENCE MEMORY</i> .....	73
4.1.1.2 <i>ACCURATEZZA DELL'APPRENDIMENTO</i> .....	75
4.1.1.3 <i>WORKING MEMORY</i> .....	76
4.1.2 <i>Analisi istologiche</i> .....	79
4.1.2.1 <i>EFFETTI ANATOMICI DELLE LESIONI</i> .....	79
4.2 EFFETTI NEUROPATOLOGICI INDOTTI DA DEPLEZIONE COLINERGICA ED INFUSIONE IPPOCAMPALE DI BETA-AMILOIDE PRE-AGGREGATA NEL RATTO.....	82
4.2.1 <i>Osservazioni generali</i> .....	82
4.2.2 <i>Analisi funzionali</i> .....	82
4.2.2.1 <i>REFERENCE MEMORY</i> .....	82
4.2.2.2 <i>ACCURATEZZA DELL'APPRENDIMENTO</i> .....	84
4.2.2.3 <i>WORKING MEMORY</i> .....	85
4.2.3 <i>Analisi istologiche</i> .....	88
4.2.3.1 <i>IL SISTEMA COLINERGICO</i> .....	88
4.2.3.2 <i>BETA-AMILOIDE 25-35</i> .....	91
4.2.3.3 <i>TAU-FOSFORILATA</i> .....	92
4.2.3.4 <i>TDP-43</i> .....	94
4.2.4 <i>Analisi del contenuto proteico dell'ippocampo</i> .....	95
4.2.4.1 <i>APP</i> .....	95
4.2.4.2 <i>TAU TOTALE</i> .....	96
4.2.4.3 <i>TAU-FOSFORILATA</i> .....	97
4.2.4.4 <i>TDP-43</i> .....	98
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>100</b>
5.1 DISFUNZIONE DELLA REGOLAZIONE MONOAMINERGICA NEL RATTO.....	101
5.2 EFFETTI NEUROPATOLOGICI INDOTTI DA DEPLEZIONE COLINERGICA ED INFUSIONE IPPOCAMPALE DI BETA-AMILOIDE PRE-AGGREGATA NEL RATTO.....	105
5.3 CONCLUSIONI.....	110

**6.BIBLIOGRAFIA.....112**

# Abbreviazioni

<b>192-IgG-sap</b>	192-Immunoglobulina G-saporina
<b>6-OHDA</b>	6-idrossidopamina
<b>AChE</b>	acetilcolinesterasi
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AD</b>	<i>Alzheimer's disease</i> - malattia di Alzheimer
<b>anti-DBH-sap</b>	anti-dopamina beta-idrossilasi-saporina
<b>AP</b>	antero-posteriore
<b>APOE</b>	apolipoproteina E
<b>APP</b>	proteina precursore dell'amiloide
<b>beta-A</b>	beta-amiloide
<b>BF</b>	<i>Basal Forebrain</i> – prosencefalo di base
<b>CA1</b>	corno d'Ammonio 1
<b>CA3</b>	corno d'Ammonio 3
<b>ChAT</b>	colina-acetiltransferasi
<b>CTX FR</b>	corteccia frontale
<b>DA</b>	dopamina
<b>DBB</b>	banda diagonale di Broca
<b>DBH</b>	dopamina beta-idrossilasi
<b>DG</b>	giro dentato
<b>GSK-3</b>	glycogen synthase kinasi-3
<b>hDBB</b>	branca orizzontale della banda diagonale di Broca
<b>i.c.v.</b>	intracerebroventricolare
<b>i.p</b>	intraperitoneale
<b>L</b>	Laterale
<b>LBD</b>	demenza con corpi di Lewy
<b>LC</b>	<i>Locus Coeruleus</i>
<b>L-DOPA</b>	L-diidrossifenilalanina
<b>LTD</b>	<i>Long Term Depression</i> – depressione a lungo termine
<b>LTP</b>	<i>Long Term Potentiation</i> – potenziamento a lungo termine
<b>MAPT</b>	microtubule associated protein tau
<b>MAPs</b>	proteine associate ai microtubuli
<b>MS</b>	setto mediale
<b>MWM</b>	<i>Morris Water Maze</i>
<b>NA</b>	noradrenalina

<b>NES</b>	segnale di esportazione nucleare
<b>NBM</b>	<i>nucleo basale magnocellulare</i>
<b>NFT</b>	<i>Neurofibrillary tangles</i> – grovigli neurofibrillari
<b>NGF</b>	<i>Nerve Growth Factor</i> – fattore di crescita neuronale
<b>NLS</b>	segnale di localizzazione nucleare
<b>P</b>	giorno di vita post-natale
<b>p75NTR</b>	recettore a bassa affinità per NGF
<b>PD</b>	<i>Parkinson's disease</i> – malattia di Parkinson
<b>PFA</b>	paraformaldeide
<b>PS</b>	presenilina
<b>RAWM</b>	<i>Radial Arm Water Maze</i>
<b>RT</b>	<i>Room Temperature</i> - temperatura ambiente
<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>SDS</b>	sodio-dodecil-solfato
<b>SLA</b>	sclerosi laterale amiotrofica
<b>SNC</b>	sistema nervoso centrale
<b>SubC</b>	<i>Sub Coeruleus</i>
<b>TAU-P</b>	tau-fosforilata
<b>TDP-43</b>	transactive response DNA-binding protein di 43 kDA
<b>TH</b>	tirosina idrossilasi
<b>V</b>	verticale
<b>vDBB</b>	branca verticale della banda diagonale di Broca
<b>VTA</b>	<i>Ventral Tegmental Area</i> – area tegmentale ventrale



# 1. Introduzione

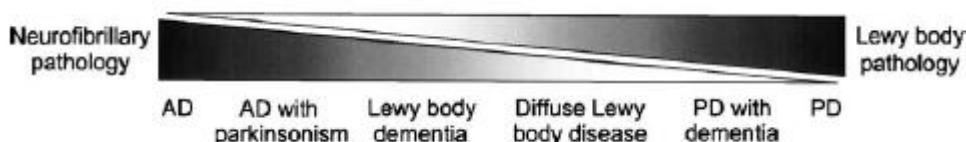
## 1.1 LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate dalla progressiva disfunzione e morte di una o più popolazioni neuronali, con conseguente atrofia delle strutture coinvolte e graduale declino delle funzioni associate. Queste patologie possono essere ereditarie o sporadiche, e tra queste si possono annoverare: la malattia di Alzheimer (AD), quella di Parkinson (PD), la sclerosi multipla (SM), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), la malattia di Huntington e vari tipi di demenza (come ad esempio la demenza dei lobi fronto-temporali o FTLT).

Attualmente, per alcune di queste, sono disponibili degli approcci terapeutici che ne rallentano il decorso, tuttavia non esiste ancora alcuna cura o trattamento che riesca a far regredire o ad arrestare la loro progressione. [Kim e De Vellis, 2009] Per questo motivo, capire le basi patofisiologiche di queste malattie e sviluppare delle terapie mirate, è una delle più importanti sfide della medicina odierna.

In particolare, in questa tesi, prenderemo in considerazione i deficit cognitivi e gli aspetti neuropatologici che sono associati a due tra le più comuni malattie neurodegenerative: la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson.

AD e PD appartengono ad una famiglia di patologie neurologiche, caratterizzate da neurodegenerazione, i cui deficit funzionali (motori, sensitivi o psicologici) sono progressivi, e la cui insorgenza si presenta tipicamente dopo la quinta o la sesta decade di vita. [Langston, 1998] Diversi studi ipotizzano che queste malattie potrebbero essere la diversa manifestazione di uno stesso processo disfunzionale (Fig. 1.1) [Appel, 1981; Eisen e Calne, 1992; Marien et al, 2004], poichè presentano vari elementi in comune, come la concomitante degenerazione dei neuroni appartenenti ai sistemi di neuromodulazione (colinergico, dopaminergico, noradrenergico e serotoninergico) [Zarow et al, 2003], ed anche la presenza, nei tessuti coinvolti, di aggregati di proteine con alterata conformazione in sede intra- od extracellulare. [Taylor et al, 2002]



**Fig. 1.1:** Alla base della malattia di Alzheimer (AD) e della malattia di Parkinson (PD) potrebbero esserci gli stessi meccanismi neurodegenerativi che vengono scatenati da fattori eziologici diversi. [Perl et al, 1998] Infatti, come si vede in figura [modificata da Dunnett e Bjorklund, 1999], da eziologie multiple si possono ottenere gli stessi fenotipi clinici, dove AD e PD rappresentano gli estremi di una dimensione comprensiva di malattie intermedie o sindromi miste.

## **1.1.1 Aspetti in comune tra AD e PD**

### **1.1.1.1 LA DEMENZA**

Nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer o da malattia di Parkinson c'è spesso una sovrapposizione di sintomi clinici. In entrambe le patologie si nota ad esempio la presenza di *demenza*.

Il termine *demenza*, che deriva dal latino *dementia* ("privo di mente"), non designa univocamente una patologia, ma viene usato per definire una compromissione globale delle funzioni cerebrali superiori, in assenza di disturbi di vigilanza. Le funzioni superiori includono abilità cognitive come la memoria, l'attenzione, le capacità esecutive (pianificazione, organizzazione) e visuospatiali, le prassie (abilità di eseguire gesti in assenza di deficit motori), il linguaggio e l'elaborazione degli stati emozionali.

Per definizione, la condizione di demenza implica la perdita di abilità precedentemente acquisite, in opposizione a quella di *oligofrenia*, che definisce invece una carenza delle stesse abilità a causa di uno sviluppo deficitario.

Le forme di *demenza* possono essere classificate in base alla progressione della malattia e all'eziologia. Esistono infatti *demenze reversibili* ed *irreversibili*. Quelle *reversibili* rappresentano una piccola percentuale, e sono secondarie a malattie o disturbi a carico di altri organi o apparati. Ne sono un esempio le demenze distiroidee e carenziali. Le forme *irreversibili* invece costituiscono la maggior parte dei casi e possono essere suddivise ulteriormente in forme *primarie* e *secondarie*. Nelle forme *primarie*, la causa principale è indicata in processi degenerativi cronici, e ne fanno parte la malattia di Alzheimer (AD), la demenza con corpi di Lewy (DLB), la demenza fronto-temporale (FTD), la demenza associata a malattia di Parkinson (PDD) e la degenerazione cortico-basale (CBD). Le forme *secondarie* sono invece conseguenza di diversi processi patologici ed includono ad esempio la demenza vascolare (VAD), l'idrocefalo normoteso (NPH), le forme post-traumatiche (PTD), la demenza da atrofia cerebrale paracarcinomatosa, la demenza da ipossia cerebrale protratta, le demenze post-infettive (incluse quelle da infezione prionica o da HIV). [Finkel, 2001]

L'AD è la forma più comune di *demenza* e costituisce circa il 60-80% di tutti i casi [Larson et al, 1992]; mentre l'incidenza di *demenza* nei pazienti affetti da PD è sei volte maggiore in confronto a controlli sani della stessa età, inoltre la sua comparsa non è correlata a bradicinesia, depressione o ai farmaci usati come trattamento. [Celesia e Wanamaker, 1972; Hakim e Mathieson, 1979]

### **1.1.1.2 LE PROTEINOPATIE**

Il termine *proteinopatie* viene usato per indicare delle malattie neurodegenerative che sono caratterizzate dall'accumulo e dall'aggregazione di specifiche proteine all'interno dei neuroni o nel parenchima cerebrale.

La malattia di Alzheimer e quella di Parkinson sono degli esempi tipici di *proteinopatie*. Altre patologie che sottostanno a questa definizione sono: la malattia associata a corpi di Lewy (LBD), le malattie prioniche, le taupatie, la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), la degenerazione dei lobi fronto-temporali e la leucoencefalopatia (CADASIL). Questa lista esula dell'essere completa, ma riflette l'eterogeneità delle diverse *proteinopatie*. [Bayer, 2013]

In un cervello sano le proteine, che svolgono dei ruoli fisiologici, hanno struttura monomerica, mentre in condizioni patologiche subiscono dei cambiamenti conformazionali che, favorendone l'associazione, portano alla formazione di oligomeri, i quali eventualmente possono anche aggregarsi in strutture di ordine superiore. Questi aggregati proteici solitamente precipitano in diverse aree cerebrali. Le proteine in questo stato possono acquisire attività tossica oppure perdere la loro normale funzione fisiologica.

Dato che gli aggregati di proteine sono caratteristiche neuropatologiche comuni a tutte le *proteinopatie*, ciò potrebbe suggerire che queste malattie neurodegenerative derivino dalla disfunzione di meccanismi molecolari simili. E' noto ad esempio che questi aggregati proteici possono essere causati da problemi di smaltimento (*clearance*) e di sovrapproduzione oppure da modificazioni post-trasduzionali che vanno ad alterare la conformazione nativa delle proteine. [Viscomi e D'Amelio, 2012]

Solitamente il quadro clinico di ogni malattia è determinato sulla base di quale popolazione neuronale risulta più vulnerabile, e viene definito dalla combinazione delle caratteristiche cliniche, patologiche e biochimiche. [Dickson, 2009]

Molte di queste malattie sono associate a mutazioni di carattere genetico [Bertram e Tanzi, 2005], il fattore di rischio più comune è l'età avanzata [Walker e LeVine Iii, 2000] ed a volte il danno da trauma cerebrale [DeKosky et al, 2010].

Alcune *proteinopatie* sono caratterizzate da un unico tipo di aggregato proteico, mentre altre ne possono contenere diversi. Molto spesso le *proteinopatie* sono miste, cioè contengono delle caratteristiche patologiche che appartengono anche ad altre malattie, e questo rende difficile una loro diagnosi e terapia. Un esempio di ciò è la presenza nei cervelli di molti pazienti affetti da AD (dal 20 al 55% dei casi), di aggregati neurofibrillari e placche di beta-amiloide, caratteristiche neuropatologiche proprie della malattia di Alzheimer, in concomitanza con accumuli di alfa-sinucleina, tipici invece della malattia a corpi di Lewy e di degenerazione della *substantia nigra*, peculiarità della malattia di Parkinson. [Leverenz e Sumi, 1986; Ditter e Mirra, 1987; Duyckaerts et al, 2009] Inoltre, alcuni lavori riportano la

presenza di inclusioni neuronali e gliali di TDP-43 (TAR DNA-binding protein di 43 kDa) in più del 25-30% di casi di AD sporadico, o del 14% nei casi di AD familiare o sindrome di Down [Bigio, 2008; Wilson et al, 2011] Nel 42-97% dei casi di PD invece, è stata riscontrata la presenza, in ippocampo e corteccia cerebrale, di placche senili e aggregati neurofibrillari, con una prevalenza di 5-6 volte più elevata rispetto a dei controlli normali. [Hakim e Mathieson, 1979; Boller et al, 1980; Gaspar e Gray, 1984]

Di seguito vengono riportate alcune delle proteine che si trovano più frequentemente sotto forma di aggregati nelle *proteinopatie*.

#### BETA-AMILOIDE:

La beta-amiloide è un peptide che viene prodotto a partire dal taglio proteolitico della proteina precursore dell'amiloide (APP), una glicoproteina integrale di membrana espressa in maniera ubiquitaria, con livelli particolarmente alti nel sistema nervoso. [Selkoe, 1994] A partire da questa proteina hanno origine diversi frammenti che svolgono compiti differenti [Hardy e Selkoe, 2002; Zhang et al, 2011]

La funzione fisiologica della APP è ancora in gran parte indeterminata, ma è stato ipotizzato che potrebbe avere un ruolo importante nella crescita dei neuriti, nella sinaptogenesi, nel traffico assonale delle proteine neuronali e nella trasduzione del segnale transmembranale. [Zheng e Koo, 2006, Priller et al, 2006; Dong et al, 2012]

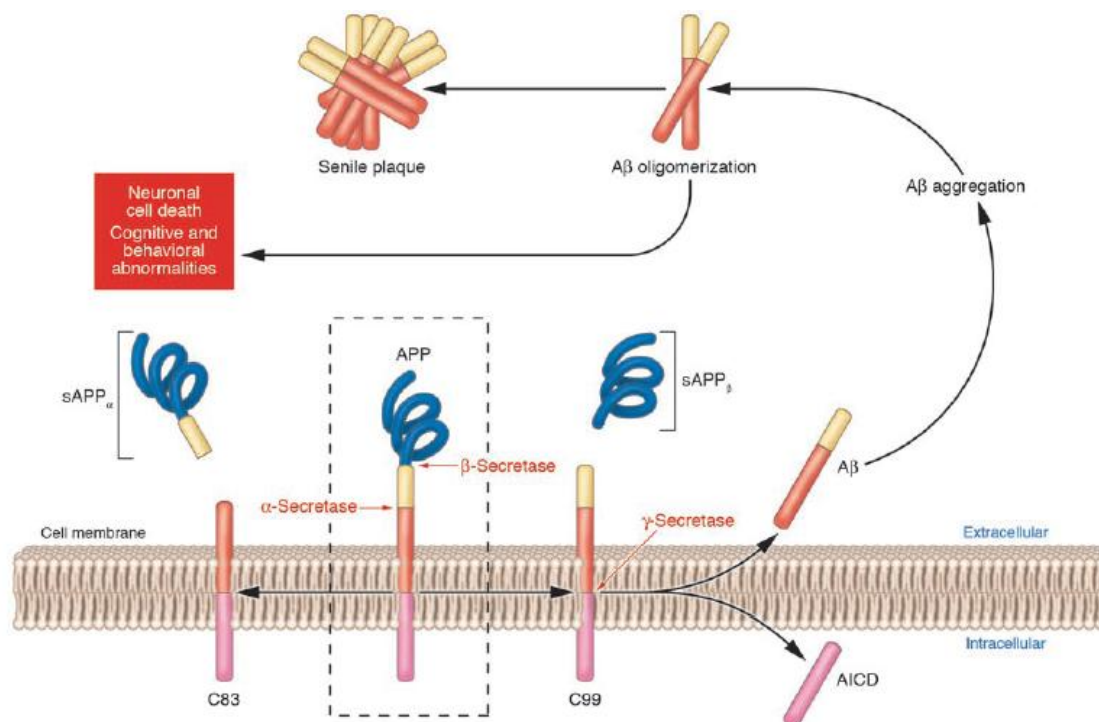
La APP è codificata a partire da un gene localizzato sul cromosoma 21, la cui presenza in copie multiple è peculiare della sindrome di Down, e la cui mutazione porta allo sviluppo di forme familiari di AD. [Waring e Rosenberg, 2008]

Una parte della APP viene internalizzata e degradata nei lisosomi [Sisodia et al, 1990], mentre un'altra piccola frazione raggiunge la membrana plasmatica e viene sottoposta a taglio proteolitico da parte di enzimi con attività secretasica (alfa-, beta- e gamma-secretasi) che danno origine ad una via amiloidogena ed ad una non-amiloidogena. (Fig. 1.2)

La via non-amiloidogena prevede il taglio della APP da parte di una alfa-secretasi, da cui derivano un frammento N-terminale solubile (sAPP-alfa) ed un frammento C-terminale che rimane ancorato alla membrana (mAPP-alfa o C83) [Weidemann et al., 1989; Haas et al., 1992].

La via amiloidogena invece comporta prima l'intervento di una beta-secretasi che taglia la APP in un frammento solubile (sAPP-beta), che viene rilasciato nello spazio extracellulare, lasciando un frammento C-terminale di 99 amminoacidi ancorato alla membrana (mAPP-beta o C99) [Seubert et al., 1993]; ed in seguito il processamento di quest'ultimo ad opera di una gamma-secretasi, che porta alla formazione del peptide di beta-amiloide e di un dominio C-terminale intracellulare della APP (AICD) [Anderson et al., 1992; Selkoe, 1994; Dong et al, 2012]. La gamma-secretasi può agire su due diversi siti di C99 e dare così origine a due

frammenti di beta-amiloide di diversa lunghezza: 1-40 ed 1-42. [Hartmann et al, 1997] Il primo è solubile ed è la forma più abbondante (costituisce circa il 90% di tutti peptidi di beta-amiloide prodotti); mentre il secondo è idrofobico ed è il responsabile della stimolazione della cascata di processi che porta alla formazione di placche e di aggregati neurofibrillari, fino alla morte neuronale. Quest'ultimo infatti è insolubile, altamente fibrillogenico ed ha un'elevata propensione ad aggregare. [Kirkitadze e Kowalska, 2005; Mohandas et al, 2009; Holtzman et al, 2011].



**Fig. 1.2:** Rappresentazione schematica del processamento di APP [Gandy, 2005]

Quindi, l'aumento della lunghezza della porzione C-terminale della beta-amiloide (da 1-40 a 1-42) ne incrementa l'aggregazione e la più rapida deposizione, promuovendo la tossicità neuronale. [Barrow e Zagorski, 1991; Iwatsubo et al, 1994; Benilova et al, 2012] Altri studi riportano che anche le specie troncate nella porzione N-terminale, come la beta-amiloide 3-42 o 4-42, potrebbero contribuire all'insorgenza di patologie neurodegenerative [Masters et al, 1985; Pike et al, 1995; Portelius et al, 2010]; infatti, la rimozione dei primi residui della porzione N-terminale, aumenta l'idrofobicità del peptide, influenzandone l'aggregazione, l'interazione con le membrane cellulari e modulandone le proprietà citotossiche.

Inoltre, tramite studi di biochimica, è stato osservato che la beta-amiloide viene anche modificata post-traduzionalmente attraverso i processi di isomerizzazione e di racemizzazione. [Mori et al, 1994; Kuo et al, 1998] Entrambe queste modificazioni

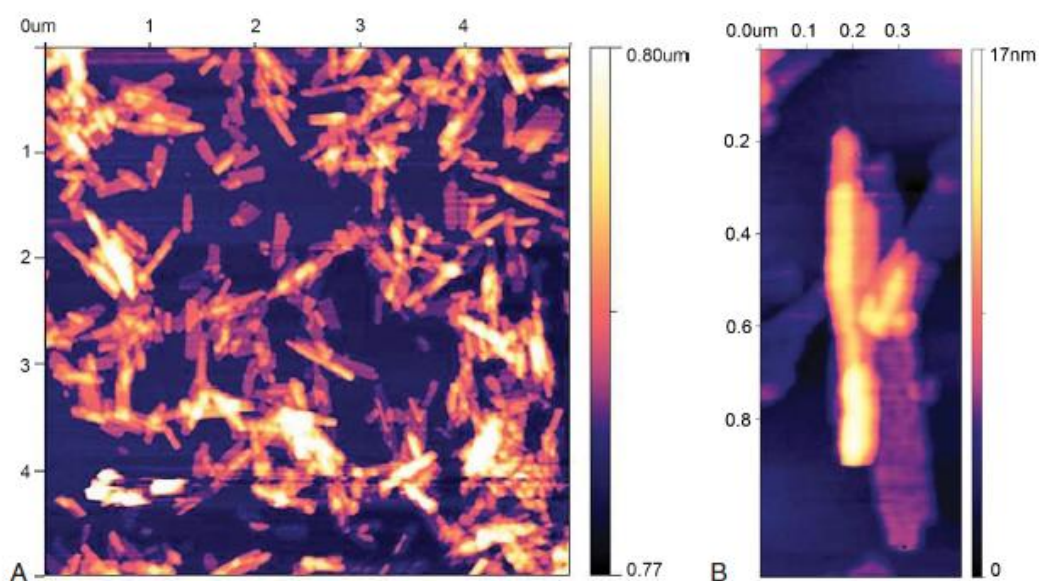
comportano un'accelerazione nell'aggregazione del peptide e nella formazione di fibrille. [Tomiyama et al, 1994]

Altre alterazioni includono l'ossidazione indotta da metalli [Dong et al, 2003] e la fosforilazione. [Milton, 2001; Kumar et al, 2011]

La beta-amiloide svolge importanti funzioni patologiche durante lo sviluppo e la progressione delle malattie neurodegenerative. Da esperimenti *in vitro* è stato visto che gli aggregati di beta-amiloide hanno effetti tossici sulle cellule, e che questo effetto deleterio è dovuto alla capacità di questo peptide di auto-aggregarsi e formare oligomeri, che a loro volta si possono unire in filamenti intermedi. E' stato dimostrato che gli oligomeri facilitano l'iperfosforilazione di Tau, distruggono i proteosomi e la funzione mitocondriale, alterano l'omeostasi del calcio e la trasmissione sinaptica. [Kamenetz et al, 2003; Pakaski e Kalman, 2008; Chrouch et al, 2008; Nimmrich et al, 2008; Mohandas et al, 2009] Inoltre, determina modificazioni nei neuroni corticali ed ippocampali, diminuisce l'espressione membranale dei recettori NMDA [Lacor et al, 2007] ed induce deficit cognitivi. [Selkoe, 2002]

La beta-amiloide, oltre ad essere neurotossica, ha anche effetti pro-infiammatori, infatti la sua deposizione *in vivo* attiva macrofagi e neutrofili. [Mattson et al, 1993; Simard et al, 2006]

Per gli esperimenti esposti in questa tesi è stato utilizzato il frammento 25-35 del peptide di beta-amiloide. Questa porzione in particolare è responsabile degli effetti neurotossici della beta-amiloide [Tran et al, 2002], inoltre da studi *in vitro* condotti su neuroni differenziati è stato visto che questo frammento causa la retrazione dendritica ed assonale, seguita da morte cellulare. La beta-amiloide 25-35 è in grado di aggregare e di dare origine a strutture fibrillari e protofibrillari che hanno effetto citotossico e che possono contribuire alla formazione delle placche senili [Delobette et al, 1997] (Fig. 1.3)



**Fig. 1.3:** Assemblamenti oligomerici e protofibrillari del peptide beta-amiloide 25-35 pre-aggregato, fotografati al microscopio a forza atomica (AFM) a bassa(A) ed elevata(B) risoluzione. In particolare in (B) si può notare la tipica struttura a foglietto-beta delle protofibrille. [Antonini et al, 2011]

TAU:

La proteina Tau viene codificata a partire da un unico gene (MAPT o microtubule associated protein tau) sito sul cromosoma 17. Nel cervello umano è espressa in sei diverse isoforme, che derivano dallo splicing alternativo del suo mRNA. [Iqbal et al, 2009] Fa parte della famiglia delle MAPs (microtubule associated proteins) e svolge un ruolo importante nell'organizzazione dei microtubuli: promuove il loro assemblamento a partire dalle subunità di tubulina e li stabilizza. [Weingarten et al, 1975; Drubin e Kirschner, 1986; Brandt e Lee, 1993; Panda et al, 1995]

Questa proteina nei neuroni immaturi ha un'espressione ubiquitaria, mentre nei neuroni maturi si trova principalmente nel compartimento assonale. [Kosik et al, 1986; Mandelkow e Mandelkow, 2012] La corretta localizzazione di Tau negli assoni è importante perchè la sua presenza nel compartimento somato-dendritico è stata vista essere riconducibile ad uno dei primi segni di neurodegenerazione. [Braak et al, 2006]

Nelle taupatie questa proteina si trova solitamente in forma aggregata (in ammassi neurofibrillari intracellulari) ed iperfosforilata. Ed è proprio questo stato di fibrillazione e fosforilazione che conferisce a Tau tossicità. [Barghorn et al, 2000] La fosforilazione causa il distacco di Tau dai microtubuli e ne facilita l'auto-aggregazione. Diversi tipi di kinasi agiscono su Tau, una di queste è la kinasi GSK-3 (glycogen synthase kinasi-3), che viene attivata ad esempio in presenza di oligomeri di beta-amiloide. [Alonso et al, 1996; Avila et al, 2004; Tokutake et al, 2012; Avila et al, 2013]

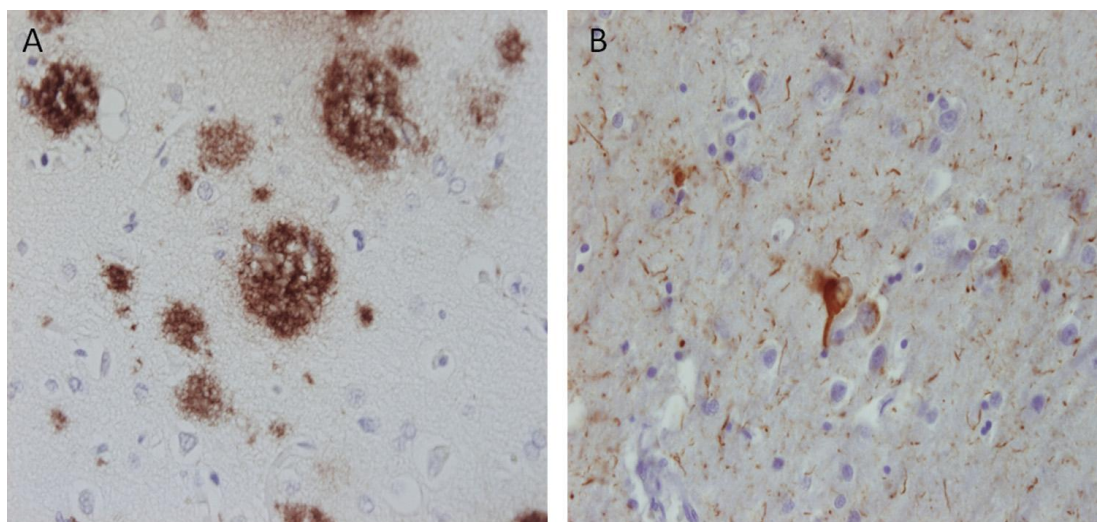
La fosforilazione comunque non è l'unica modificazione post-traduzionale che può subire Tau, è stato visto infatti che anche altre alterazioni possono condurla ad aggregare, tra queste sono incluse: la glicosilazione, la glicazione, la prolil-isomerizzazione, il clivaggio o la troncazione, la nitratura, la poliaminazione, l'ubiquitinazione, la sumoilazione e l'ossidazione. [Chen et al, 2004; Gong et al, 2005; Ballatore et al, 2007; Martin et al, 2011]

Quello che è ancora argomento di dibattito è se l'alterazione di Tau è una causa od una conseguenza del processo patologico; anche se nel caso della malattia di Alzheimer sembra sia chiaramente un effetto dovuto alla precedente aggregazione della beta-amiloide. [Hass e Selkoe, 2007] (Fig. 1.4)

I grovigli neurofibrillari di Tau sono solitamente intracellulari, agiscono danneggiando le funzioni citoplasmatiche ed interferendo con il normale trasporto assonale; ma recentemente è stato visto che Tau può avere anche effetti deleteri agendo a livello extracellulare. Infatti, dopo la morte neuronale Tau fuoriesce dalle cellule, e legandosi ai recettori muscarinici (M1 ed M3), provoca l'aumento del calcio intracellulare, il quale tramite effetto eccitotossico può danneggiare i neuroni ed i circuiti coinvolti. [Gomez-Ramos et al, 2008; Gomez-Ramos et al, 2009; Avila et al, 2013]



L'aggregazione di Tau nei neuroni e nelle cellule gliali è chiaramente correlata a disfunzioni cognitive e a morte neuronale. [Lu e Wood, 1993; Forst et al, 2009]



**Fig. 1.4:** Placche positive per beta-amiloide (A) e aggregati neurofibrillari positivi alla tau iperfosforilata (B) in un caso di AD. [Bayer, 2013]

#### ALFA-SINUCLEINA:

L'alfa-sinucleina è membro di una famiglia di proteine che ha funzioni pleiotropiche e nella quale sono comprese anche la beta-sinucleina e la gamma-sinucleina. [Clayton e George, 1998] E' stata originariamente scoperta come componente non-amiloide delle placche senili nell'AD. [Iwai et al, 1996; Masliah et al, 1996b]

Mutazioni nel gene dell'alfa-sinucleina (SNCA) sono state trovate in individui affetti da PD familiare. [Polymeropoulos et al, 1997] Ed i corpi di Lewy, caratteristici della malattia di Parkinson, sono costituiti proprio da aggregati di alfa-sinucleina [Spillantini et al, 1997]

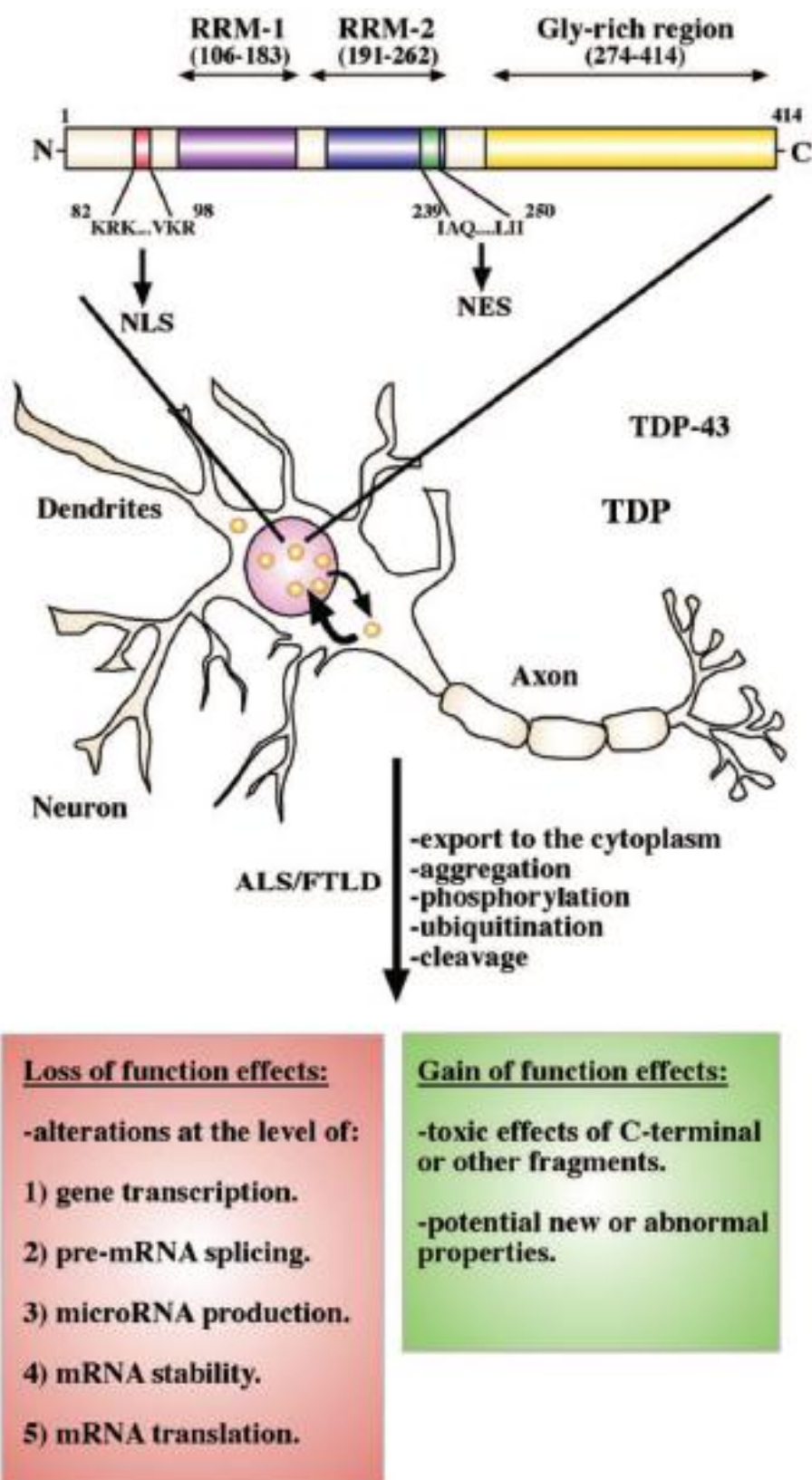
Diverse modificazioni post-traduzionali dell'alfa-sinucleina sono state associate allo sviluppo di patologie neurodegenerative, tra queste alterazioni si possono annoverare: la fosforilazione, l'ubiquitinazione, la nitratura e la troncazione. [Oueslati et al, 2010; Beyer e Ariza, 2012]

E' stato visto che l'alfa-sinucleina reagisce con i prodotti di degradazione enzimatica della dopamina (DA), in particolare il metabolita 3,4-diidrossifenilacetaldide (DOPAL) risulta tossico, perchè ne promuove l'aggregazione sia *in vivo* che *in vitro*. [Li et al, 2001; Burke et al, 2008]

#### TDP-43 (transactive response DNA-binding protein di 43 kDA):

TDP-43 è una proteina di 43 kDA costituita da 414 amminoacidi e codificata a partire dal gene TARDBP. Questo gene è sito sul cromosoma 1, è composto da 6 esoni e può andare incontro a 11 diverse forme di splicing alternativo. [Buratti e Baralle, 2008; Nishimoto et al, 2010]





**Fig. 1.5:** Rappresentazione schematica della struttura della proteina TDP-43 (parte alta della figura) e della sua localizzazione cellulare in condizioni fisiologiche (parte mediale della figura). In condizioni normali TDP-43 passa continuamente dal nucleo al citoplasma e viceversa, pur trovandosi prevalentemente nel compartimento nucleare. Negli stati patologici invece è ubiquitinata, clivata, fosforilata e forma aggregati insolubili nel citoplasma. Nella parte inferiore della figura sono mostrati diversi tipi di meccanismi patologici (da acquisto o perdita di funzione) che possono condurre a perdita neuronale. [Buratti e Baralle, 2010]

TDP-43 fa parte della famiglia delle ribonucleoproteine (hnRNP), è altamente conservata, è espressa in molti tessuti (tra i quali sono compresi il midollo spinale ed il cervello), ed in condizioni fisiologiche è localizzata prevalentemente nel nucleo. [Buratti et al, 2001; Bigio, 2008; Wang et al, 2008]

E' coinvolta in diversi processi, quali: la stabilizzazione dell'mRNA, la biogenesi dei microRNA, la trascrizione genica, la replicazione e la riparazione del DNA, la divisione cellulare e la regolazione della plasticità neuronale. [Strong et al, 2007; Buratti e Baralle, 2010]

Nella sua struttura sono presenti due domini di riconoscimento dell'RNA (RRM1 e RRM2), tramite i quali può legarsi a sequenze di DNA e di RNA, ed una regione C-terminale ricca in glicina che media l'interazione con altre proteine, regola l'attività di splicing ed influenza la solubilità di TDP-43. Inoltre, al suo interno contiene una sequenza segnale di localizzazione nucleare (NLS) ed un'altra ricca in leucina che invece funge da segnale di esportazione nucleare (NES). Queste sequenze di importazione ed esportazione nucleare permettono a TDP-43 di passare dal nucleo al citoplasma, e viceversa, in modo trascrizione-dipendente. [Ayala et al, 2008] E' stato visto che è proprio nella disfunzione del suo regolare traffico tra il nucleo ed il citoplasma che risiede la patogenicità di TDP-43. Infatti, nelle proteinopatie in cui è coinvolta, viene sequestrata nel citoplasma sotto forma di aggregati insolubili e non è più in grado di rientrare nel nucleo. [Arai et al, 2006; Winton et al, 2008; Gendron e Petrucelli, 2011; Tremblay et al, 2011] Questi aggregati, che tendono ad accumularsi in diverse regioni cerebrali (quali l'ippocampo e la neocorteccia), rappresentano una delle caratteristiche tipiche della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e della demenza da degenerazione dei lobi fronto-temporali con inclusioni ubiquitina-positive (FTLD-U). [Lagier-Tourenne e Cleveland, 2009] Recentemente è stato osservato che anche un gran numero di pazienti affetti da AD (circa il 75%) presenta immunoreattività anormale di TDP-43. [Amador-Ortiz et al, 2007; Hu et al, 2008; Lippa et al, 2009] In tutti questi casi le inclusioni immunoreattive per TDP-43 si trovano nel citoplasma dei neuroni e delle cellule gliali, e presentano un'anomala iperfosforilazione ed ubiquitinazione di questa proteina.

L'aberrante accumulazione, l'errata localizzazione e l'iperfosforilazione possono essere la conseguenza di diverse mutazioni che possono incorrere nel gene TARDBP. In particolare, la maggior parte di queste è stata vista essere localizzata nell'esone 6 codificante per il dominio C-terminale di TDP-43, che quindi è stato ipotizzato essere il responsabile dell'effetto neurotossico di TDP-43. [Gendron et al, 2011]

Oltre a queste mutazioni geniche, TDP-43 può incorrere anche ad errato clivaggio, che porta alla generazione di frammenti C-terminali di 35 e 25 kDA, ubiquinati e fosforilati, in cui manca il segnale di indirizzamento nucleare. [Zhang et al, 2009]

I meccanismi molecolari che provocano l'aggregazione delle proteine nel citoplasma non sono ancora noti, e non si sa neppure se questa è causa o conseguenza del processo patologico. Si ipotizza che la neurodegenerazione portrebbe essere causata dall'alterazione del metabolismo degli RNA a livelli differenti (come nel processo di splicing dei pre-mRNA, nel trasporto degli mRNA e nella stabilizzazione dei microRNA). [Neumann, 2009; Budini e Buratti, 2011] Queste alterazioni potrebbero risultare in una perdita di funzioni di TDP-43 nel nucleo, a causa ad esempio dell'inibizione della sua produzione ad opera di meccanismi di feed-back (effetto da perdita di funzione), oppure in un'alterata localizzazione, o ancora nel rilascio nel citoplasma di frammenti C-terminali potenzialmente citotossici (effetto da acquisto di funzione). [Buratti e Baralle, 2010] (Fig. 1.5)

### **1.1.1.3 LA DEGENERAZIONE DEL LOCUS COERULEUS**

Sia la malattia di Alzheimer (AD) che quella di Parkinson (PD) sono associate a neurodegenerazione di nuclei sottocorticali. La degenerazione dei neuroni colinergici del nucleo basale (NB) è caratteristica dell'AD, ma avviene anche nel PD. [Rogers et al, 1985] La perdita dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SN) è invece peculiarità del PD [Gibb, 1988], ma può avvenire anche in grado variabile nell'AD. [Victoroff et al, 1996] La deplezione dei neuroni noradrenergici del *Locus Coeruleus* è invece ben riscontrata in entrambe queste patologie. [Mann et al, 1985; Zweig et al, 1993]

Il *Locus Coeruleus* (LC) costituisce il maggior raggruppamento di cellule noradrenergiche del sistema nervoso centrale ed è localizzato nel ponte, lateralmente al quarto ventricolo. [Aston-Jones et al, 2000] In media, il LC di un cervello umano di un giovane adulto contiene da 45000 a 60000 neuroni noradrenergici. [Baker et al, 1989] Durante il normale invecchiamento, tra la quarta e la nona decade di vita, il numero di cellule del LC e la concentrazione di noradrenalina nel cervello vengono ridotti rispettivamente del 25% e del 50%. [Mann, 1983; Mann et al, 1983] Da analisi *post-mortem* di cervelli di pazienti affetti da AD, PD e sindrome di Down, si è visto che il numero delle cellule del LC viene ridotto del 60% rispetto a controlli sani della stessa età. [German et al, 1992] Attraverso ricostruzioni tridimensionali computerizzate [German et al, 1988; Chan-Palay, 1991] e l'analisi della distribuzione quantitativa delle cellule del LC umano è stato visto che nell'AD si ha prevalentemente perdita neuronale nella parte mediale di questo nucleo, mentre nel PD la perdita è per lo più caudale. [German et al, 1992] Inoltre, da uno studio su tessuti autoptici, è stato visto che sia nell'AD che nel PD la percentuale di perdita cellulare risulta essere maggiore nel LC (rispettivamente del 67,9% e 83,2%) in confronto con gli altri nuclei sottocorticali coinvolti in queste due patologie, cioè il nucleo basale (41,1%) e la *substantia nigra pars compacta* (77,8%). [Zarow et al, 2003] E' stato perciò ipotizzato che i cambiamenti

del LC potrebbero derivare da un primario coinvolgimento del LC nelle fasi iniziali della patogenesi di AD e PD. [Mann et al, 1982; Hoogendijk et al, 1995]

Significative riduzioni nel numero di cellule del LC sono state riportate anche in altre malattie neurodegenerative quali: la malattia di Huntington [Zweig et al, 1992], la degenerazione corticobasale [Gibb et al, 1989], la demenza pugilistica [Mann et al, 1983], la malattia a corpi di Lewy [Sugiyama et al, 1993] Nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA) invece non c'è apparente perdita di neuroni del LC [Hoogendijk et al, 1995], ma spesso questi neuroni contengono aggregati neurofibrillari. [Kokubo et al, 2000; Orrell et al, 1995]

### **1.1.2 La malattia di Alzheimer**

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia neurodegenerativa progressiva di eziologia ignota che colpisce prevalentemente le persone sopra i 60 anni di età. E' caratterizzata da un declino graduale delle funzioni cognitive (quali la memoria per eventi recenti e remoti, il linguaggio, la capacità di giudizio, l'attenzione) ed esecutive (quali la pianificazione e l'organizzazione). [Marien et al, 2004] Al mondo ci sono circa 35 milioni di persone affette da AD e si prevede che nel 2030 il loro numero aumenterà fino a raggiungere i 70 milioni [Dartigues, 2009].

Questa malattia prende il nome dallo psichiatra tedesco Alois Alzheimer, il quale nel 1906, durante un convegno a Monaco, presentò per la prima volta la sindrome clinico-patologica riscontrata su una donna cinquantenne (Auguste D.). Questa paziente presentava problemi progressivi alla memoria, al linguaggio e nel comportamento. Quando morì, il dottor Alzheimer ne esaminò il cervello ed identificò delle modificazioni interessanti del tessuto, quali: atrofia cerebrale, dense deposizioni di beta-amiloide attorno alle cellule nervose (le placche neuritiche) ed intracellularmente dei grovigli di fibre costituiti dalla proteina Tau iperfosforilata (gli accumuli neurofibrillari). [Watson e Seiden, 1984; Jellinger, 2009]

Sebbene questa patologia sia stata identificata più di 100 anni fa, l'interesse della ricerca verso sintomi, le cause, i fattori di rischio che la caratterizzano ed i possibili trattamenti è sbocciato solo negli ultimi 30 anni. Attualmente le cause che conducono allo sviluppo di questa patologia sono ancora ignote e l'indagine sulle cure da adottare sta procedendo lentamente anche per la mancanza di un animale modello completo con cui poter studiare l'AD.

#### **1.1.2.1 FISIOPATOLOGIA**

In base all'età d'insorgenza ed alla familiarità è possibile distinguere due diversi tipi di AD:

- *AD familiare (Familiar AD - FAD)*

- *AD ad insorgenza tardiva (Late Onset AD – LOAD).*

La forma familiare è caratterizzata da un'insorgenza precoce (prima dei 60 anni), da una trasmissione mendeliana autosomica dominante e rappresenta l'1% di tutti i casi di AD. [Goate et al, 1991] La FAD è causata principalmente dalla mutazione di tre geni che codificano rispettivamente per: la presenilina 1 (PSEN1, sul cromosoma 14), la presenilina 2 (PSEN2, sul cromosoma 1) e la proteina precursore della beta-amiloide (APP, sul cromosoma 21). [Crook et al, 1998; Williamson et al, 2009]

Il LOAD invece è caratterizzato da un'insorgenza più tardiva (oltre i 60 anni) e un pattern molto complesso. Si è visto che l'apolipoproteina E (APOE, sul cromosoma 19) è un fattore di suscettibilità per lo sviluppo del LOAD. [Ertekin-Taner et al, 2007]

Nonostante le diverse cause d'insorgenza, queste forme di AD presentano le stesse caratteristiche patologiche, sia a livello microscopico (placche di beta-amiloide, perdita di neuroni colinergici, grovigli neurofibrillari) che macroscopico (atrofia corticale e sottocorticale). [Apostolova e Thompson, 2008; Apostolova et al, 2011]

In entrambe queste forme i sintomi si aggravano con il passare del tempo, perciò è possibile identificare diversi stadi di AD che vengono così ripartiti:

- Nello *stadio preclinico* i pazienti non presentano sintomi comportamentali, ma si può già notare l'accumulo di placche di beta-amiloide e di Tau nel cervello, con conseguente disfunzione e morte neuronale.
- Nell'*AD lieve* (durata media 2-4 anni) i primi sintomi a comparire sono: la perdita di memoria, la difficoltà nel trovare le parole, la compromissione della visione e della percezione dello spazio, deficit di giudizio e di ragionamento, cambiamenti d'umore e personalità. In questa fase viene spesso diagnosticato l'AD.
- Nell'*AD moderato* (durata media 2-10 anni) si riscontrano danni a livello delle aree cerebrali che controllano il linguaggio, il ragionamento, i processi sensoriali ed il pensiero cosciente. I pazienti iniziano ad avere problemi a riconoscere i familiari e gli amici ed ad imparare cose nuove, inoltre sono affetti da allucinazioni, sentimenti di delusione e paranoia.
- L'*AD grave* (durata media 3 anni) è caratterizzato da critiche condizioni generali del paziente, egli infatti non può più comunicare ed è completamente dipendente dalle cure degli altri. In questo stadio le placche ed i grovigli neurofibrillari si trovano sparsi per tutto cervello ed il tessuto risulta essere molto atrofizzato. Anche le abilità motorie del paziente sono compromesse, ed i processi basilari come la digestione, la respirazione e l'escrezione risultano rallentati.

Il meccanismo fisiopatologico che porta all'insorgenza della malattia di Alzheimer è tutt'ora ignoto, però a riguardo sono state formulate una moltitudine di ipotesi sulla sua eziogenesi e patogenesi, tra le quali troviamo il coinvolgimento di fattori genetici e vascolari, dello stress

ossidativo, della disfunzione dell'omeostasi del calcio, di squilibri ormonali, di processi infiammatori e reazioni immunitarie, dell'alterazione del ciclo cellulare e della disfunzione neurotrasmettitoriale. Fin'ora tra le più accreditate troviamo l'ipotesi colinergica, l'ipotesi della cascata della beta-amiloide e l'ipotesi della Tau-iperfosforilata, che vengono esposte qui di seguito. [Mohandas et al, 2009]

#### L'IPOTESI COLINERGICA:

L'AD viene spesso catalogato come una patologia che coinvolge l'innervazione colinergica [Bartus et al, 1982; Coyle et al, 1983], poichè da analisi autoptiche di pazienti risulta esserci una grave deplezione (60-90%) nella corteccia e nell'ippocampo dell'enzima che sintetizza l'acetilcolina, cioè la colina acetiltransferasi (ChAT) [Perry et al, 1977]; ed una riduzione del 30-90% nel numero dei neuroni colinergici presenti nel nucleo basale di Meynert (nbM). [Davies e Maloney, 1976; Perry, 1980; Whitehouse et al, 1982]

Inoltre, da studi post-mortem, dall'analisi delle conseguenze comportamentali dei farmaci colinomimetici e di lesioni colinergiche, è stato visto che il grado di deplezione colinergica o della sua disfunzione neurotrasmettitoriale correla positivamente con la gravità dei deficit cognitivi. [Wilcock et al, 1982; DeKosky et al, 1992; Francis et al, 1999]

Il primo a considerare l'AD una patologia derivante da un deficit di innervazione colinergica fu Bartus nel 1982, descrivendo l'"ipotesi colinergica della disfunzione mnemonica in età geriatrica". [Bartus et al, 1982; Coyle et al, 1983]

Successivamente, diversi studi hanno indagato la relazione tra i livelli cerebrali di ACh e la performance di animali in compiti di apprendimento spaziale. [Bennett et al, 2007; Muthuraju et al, 2009] Da queste ricerche è emerso che la capacità di apprendimento migliora con l'attivazione del sistema colinergico. A conferma di ciò, si è visto che dopo la somministrazione di antagonisti muscarinici, quali atropina e scopolamina, la performance dei ratti in compiti di apprendimento e memoria viene ridotta. [D'Hooge e De Deyn, 2001] Inoltre, studi farmacologici effettuati sull'uomo hanno mostrato come tali sostanze impediscano la formazione di nuove memorie senza influenzare il recupero di eventi remoti. [Hasselmo, 2006] Al contrario, sostanze ad azione colinomimetica promuovono l'acquisizione di nuove tracce di memoria sia nell'uomo che nei modelli animali. [Buccafusco et al, 2005] Questo dimostra quanto l'attivazione dei recettori colinergici possa essere una componente importante nel processo di consolidamento della memoria. [Power et al., 2003]

Inoltre, si ritiene che la ridotta sintesi del neurotrasmettitore acetilcolina, oltre alla comparsa di deficit cognitivi, possa promuovere l'inizio della cascata di aggregazione della beta-amiloide [Nitsch et al, 1992; Leanza, 1998; Lin et al, 1998] e condurre ad uno stato d'infiammazione generale. [Wenk, 2003]

Al giorno d'oggi è chiaro che il sistema colinergico è cruciale per i processi di apprendimento e memoria [Auld et al, 2002], anche se le disfunzioni che lo coinvolgono potrebbero causare deficit cognitivi in modo indiretto, ad esempio interferendo con i processi attentivi. [Francis et al, 1999] Il suo ruolo nella regolazione di questi processi è perciò ancora ampiamente dibattuto, poichè è difficile assegnare la piena responsabilità di meccanismi tanto complessi ad un unico sistema neurale o ad una singola area cerebrale. [Dunnett et al, 1991; Chappell et al, 1998]

#### L'IPOTESI AMILOIDE:

Grazie all'innovazione delle tecniche di biologia molecolare, nel 1991 la beta-amiloide venne introdotta tra le ipotesi che cercano di spiegare l'origine dell'AD. Infatti, il ritrovamento di placche senili nei cervelli dei pazienti affetti da questa malattia, fu considerato da quel momento uno dei tratti distintivi per la diagnosi differenziale di AD. Inoltre si ipotizzò che la presenza di questi depositi di beta-amiloide fosse una delle principali cause di sviluppo di tale patologia neurodegenerativa. [Hardy e Allsop, 1991]

Questa ipotesi si focalizza in particolare sulla disfunzione dei meccanismi di produzione, smaltimento ed accumulo extra-cellulare della beta-amiloide [Hardy e Selkoe, 2002], e di come le placche senili svolgano degli effetti citotossici nel tessuto cerebrale in cui si depositano. Come descritto in precedenza, queste placche sono costituite da aggregati filamentosi di beta-amiloide (prevalentemente 1-42), peptide che viene prodotto dalla proteolisi della proteina precursore dell'amiloide (APP). [Jarrett et al, 1993]

A favore di quest'ipotesi, vi è l'evidenza che mutazioni a carico della APP portano a sviluppare FAD ad esordio precoce; inoltre è noto che anche tutte le altre mutazioni associate alla malattia determinano un aumento nella produzione di beta-amiloide.

In modelli transgenici di topo è stato visto che la sovra-espressione di APP determina la comparsa di placche e deficit di apprendimento e memoria simili a quelle presenti nei malati di AD. [Cummings, 2004] Ed in studi *in vivo* su ratti adulti si è osservato la comparsa di disfunzioni cerebrali, deficit di memoria ed alterazioni neuronali dopo l'infusione della beta-amiloide 1-42 nei ventricoli laterali di questi animali; mentre dalle analisi istologiche dei loro cervelli si è trovato atrofia del tessuto, espansione dei ventricoli e danno neuronale nell'area CA1 dell'ippocampo. [Nakamura et al, 2001] Un simile risultato è stato ottenuto anche da un altro lavoro in cui invece veniva somministrato il frammento di beta-amiloide 25-35 all'interno del nucleo basale magnocellulare. [Harkany et al, 1998] In letteratura è documentato che la beta-amiloide 1-42 è tossica ad elevate concentrazioni *in vitro* e di come la sua deposizione richiami macrofagi e neutrofilo *in vivo*. [Mattson et al, 1993] Oltre a questo si è visto che in presenza di beta-amiloide 1-42, i neuroni corticali ed ippocampali, sebbene

non siano condotti necessariamente alla morte, subiscono modificazioni tali da indurre dei deficit cognitivi e mnemonici riconducibili all'AD. [Selkoe, 2002]

Ed un'ulteriore evidenza del ruolo centrale della beta-amiloide nell'insorgenza della malattia è data dal fatto che la presenza dell'apolipoproteina E-4 (APOE-4), nota per essere associata ad una maggior probabilità di sviluppare l'AD, determina una più rapida deposizione delle placche amiloidi [Butterfield et al, 2002]

Recentemente è stato osservato che, oltre alla ben conosciuta deposizione extra-cellulare di placche amiloidi nel parenchima cerebrale, i peptidi di beta-amiloide si accumulano anche all'interno di compartimenti neuronali intracellulari, in particolare nelle sinapsi. [Gouras et al, 2010] Ed è stato ipotizzato che questo iniziale accumulo potrebbe essere uno dei primi eventi patologici che scatenano la cascata della beta-amiloide conducendo poi a perdita neuronale. [Wirhth et al, 2004]

Alla luce di queste evidenze è possibile concludere che la perdita di regolazione nel processamento di APP e nell'accumulo di beta-amiloide nel cervello, potrebbe contribuire direttamente al danno neuronale e sinaptico, quindi alla patogenesi della malattia di Alzheimer. [Zheng e Koo, 2006]

#### L'IPOTESI TAU-FOSFORILATA:

La malattia di Alzheimer appartiene anche al gruppo delle taupatie, malattie neurodegenerative caratterizzate dall'aggregazione, sia nei neuroni che nelle cellule gliali, della proteina associata ai microtubuli Tau, correlata a disfunzioni cognitive e morte neuronale. [Lu e Wood, 1993] Infatti, oltre alle placche di beta-amiloide, nei cervelli dei pazienti affetti da AD è stata trovata la presenza di grovigli intracellulari con differente distribuzione tissutale (in corteccia cerebrale, ippocampo, nuclei sottocorticali) ed il cui numero correla con il grado di demenza, la perdita neuronale e la riduzione delle sinapsi. [Braak e Braak, 1991; Brion et al, 1991; Goedert, 1996; Braak et al, 2006]

Per descrivere il ruolo della proteina Tau nell'AD, è stata introdotta l'ipotesi della Tau fosforilata: un'eccessiva o anormale fosforilazione di Tau risulta nell'aggregazione di Tau in filamenti accoppiati ad elica (PHF-Tau) ed in grovigli neurofibrillari (NTFs), la cui deposizione correla positivamente con la progressione dell'AD per quanto riguarda sia il declino cognitivo che la neurodegenerazione. [Honson e Kuret, 2008].

Si è visto che mutazioni che alterano la funzione e l'espressione delle isoforme di Tau portano alla sua iperfosforilazione. Questo stato impedisce a Tau di legarsi alla tubulina, di promuovere l'assemblamento dei microtubuli, la conducono ad auto-aggregarsi in filamenti accoppiati ad elica ed a sequestrare le altre proteine normalmente associate ai microtubuli (MAPs). [Iqbal et al, 2009] Inoltre in questa forma Tau risulta insolubile, danneggiando le funzioni citoplasmatiche ed il trasporto assonale, conducendo quindi a morte neuronale.



Si sa che la proteina Tau è substrato di diverse proteine kinasi, quali la kinasi glicogeno sintetasi-3 (GSK-3), la proteina kinasi dipendente dalla ciclina-5 (cdk-5), la proteina kinasi A (PKA) ed altre; ma non è ancora noto come venga generata la Tau iperfosforilata. Lavori *in vitro* ed *in vivo* fin'ora hanno dimostrato che la GSK-3 potrebbe svolgere un ruolo considerevole in questo processo, poichè presenta un impatto notevole sulla regolazione delle isoforme di Tau [Voss e Gamblin, 2009], aumenta la produzione di beta-amiloide e nell'AD la sua attività risulta aumentata. [Hooper et al, 2008]

L'ipotesi della Tau-fosforilata è stata quindi formulata perchè si sono viste delle correlazione tra i livelli di lesioni neurofibrillari ed il grado di neurodegenerazione, ma ancora ad oggi molti dei meccanismi che regolano la sua iperfosforilazione, aggregazione e tossicità sono da chiarire, per questo motivo sarebbero necessari dei modelli di malattia più accurati e validi.

#### ALTRE IPOTESI:

L'AD è una malattia davvero complessa, che sembra causata dall'interazione di diversi fattori, in cui l'accumulo di beta-amiloide e la deplezione colinergica rappresentano solo un particolare aspetto della malattia. Per questo motivo esistono molte altre ipotesi che cercano di spiegare la sua eziogenesi e patogenesi. Tra queste troviamo:

- *L'ipotesi infiammatoria*, che supporta l'idea che l'AD può essere determinato da processi infiammatori che coinvolgono la microglia, gli astrociti ed i neuroni. L'invecchiamento è accompagnato infatti da una progressiva alterazione del sistema immunitario, in particolare è presente un continuo stato infiammatorio che può portare ad una disfunzione degli organi. [Fulop et al, 2005; Fulop et al, 2013] Si è visto inoltre che le citochine pro-infiammatorie controllano l'attività del gene APP, incrementandola. [Wright et al, 2013]
- *L'ipotesi eccitotossica da glutammato*, è basata sull'osservazione di iper-attività glutammatergica nei malati di AD. La disfunzione nel trasportatore del glutammato, sia nei neuroni che negli astrociti, provocherebbe infatti un eccesso di questo neurotrasmettitore nello spazio sinaptico, che causerebbe eccitotossicità e danno neuronale. [Masliah et al, 1996a; Li et al, 1997]
- *L'ipotesi ipoglutammatergica*, si oppone a quella precedente e parte dall'osservazione che nei casi di AD la neurotrasmissione glutammatergica corticale ed ippocampale è gravemente danneggiata [Maragos et al, 1987; Palmer e Gershon, 1990] e che c'è una riduzione nel numero dei recettori NMDA. [Greenamyre, 1986]
- *L'ipotesi dello stress ossidativo* afferma che l'attività delle specie reattive dell'ossigeno (ROS o radicali liberi) potrebbero provocare danno ossidativo nelle cellule e causarne la morte.

- *L'ipotesi vascolare* propone uno sviluppo dell'AD correlato all'aumento dei fattori di rischio vascolari. In molti casi clinici di AD si notano infatti delle alterazioni nelle arterie dei pazienti, ma potrebbero essere semplicemente casi di demenza mista, tra AD e demenza vascolare. [Maksimovich, 2012]
- *L'ipotesi del colesterolo*, in cui è coinvolta l'apoproteina E (ApoE), essenziale per il catabolismo delle lipoproteine costituenti i trigliceridi, che sembra cruciale anche nell'influenzare l'insorgenza dell'AD e la deposizione delle placche di beta-amiloide.
- *L'ipotesi dei metalli*, formulata dopo il ritrovamento nelle placche di beta-amiloide di alte concentrazioni degli ioni rame, ferro e zinco. Si sa inoltre che sia la beta-amiloide che l'APP presentano nella loro struttura dei siti di legame per questi ioni metallici.
- *L'ipotesi prionica*, assume che una proteina prionica potrebbe essere l'agente eziologico dell'AD. Infatti, da studi su roditori si è visto che se nel cervello di questi vengono inoculati dei preparati a base di materia cerebrale umana colpita da AD, essi sviluppano la malattia dopo circa 3 anni e mezzo. Oppure, in un altro studio si è visto che, iniettando nel parenchima cerebrale dei topi delle proteine Tau mutate, queste formano aggregati dopo circa un anno. Questo fornisce la dimostrazione che la malattia è trasmissibile, molto probabilmente tramite un agente prionico. [Castellani et al, 2004]
- *L'ipotesi dell'ipofunzione di sistemi neuronali*, quali ad esempio il sistema noradrenergico [Marien et al, 2004], quello serotoninergico [Zarros et al, 2005] e dopaminergico. Da analisi *post-mortem* dei cervelli di pazienti affetti da AD si è visto infatti che, in aggiunta ai gravi deficit del sistema colinergico, anche altri sistemi neurotrasmettitoriali presentano delle alterazioni (quali appunto: il sistema noradrenergico, serotoninergico, e dopaminergico). [Dringenberg, 2000] Il fatto che l'AD potrebbe non essere solo un deficit colinergico, ma potrebbe coinvolgere anche la disfunzione di altri sistemi neurotrasmettitoriali, è avvalorato anche dall'evidenza che i farmaci colinomimetici (i quali prevedono un approccio puramente colinergico) hanno riscontrato un successo solo parziale nella terapia per la malattia di Alzheimer. [Scarpini et al, 2003]

Inoltre, è da notare che nei cervelli di pazienti affetti da AD, la perdita neuronale nel LC è stata vista essere più vasta e meglio correlata con la durata della malattia, in confronto a quella che avviene invece nel nucleo basale degli stessi. [Zarow et al, 2003] Tale diminuzione dei neuroni del LC correla significativamente con il numero di placche di beta-amiloide, di aggregati neurofibrillari e con il grado di demenza. [Bondareff et al, 1987] Diversi studi inoltre mostrano come la neurodegenerazione del LC ed il metabolismo della beta-amiloide siano strettamente correlati. Ad

esempio Heneka e collaboratori sono stati i primi ad ossevare che effettuando una deplezione del sistema noradrenergico simultaneamente all'infusione in corteccia di beta-amiloide 1-42 preaggregata, veniva indotto un notevole aumento della risposta infiammatoria mediata dalla beta-amiloide. [Heneka et al, 2002] Inoltre, in animali transgenici che recano la forma mutata dell'APP umana, lesioni simili provocano un considerevole aumento della risposta infiammatoria, della deposizione di placche amiloidi, della neurodegenerazione in *corteccia* ed *ippocampo*, ed un peggioramento delle funzioni cognitive. [Heneka et al, 2006] Resta tuttavia da chiarire se sia la degenerazione dei neuroni noradrenergici a determinare un aumento della deposizione di placche amiloidi o viceversa. Da diversi lavori emerge come la neurodegenerazione a carico del LC sia almeno contemporanea alla deposizione degli aggregati amiloidi. Inoltre, come è già stato detto, è stato osservato che in pazienti affetti da AD si ha una precoce degenerazione dei neuroni noradrenergici, forse dovuta alla presenza nel LC di numerosi ammassi neurofibrillari. [Grudzien et al, 2007] Si pensa che la rimozione dell'innervazione noradrenergica porti da un lato all'inibizione della neprilisina, un enzima metalloproteasi zinco-dipendente coinvolto nella degradazione del beta-amiloide, come si osserva negli animali lesionati con DSP-4, e dall'altro alla mancata fagocitosi del beta-amiloide; infatti, studi *in vitro*, hanno dimostrato come la noradrenalina stimoli la fagocitosi della beta-amiloide 1-42 da parte della microglia. [Kalinin et al, 2007] In conclusione è stato ipotizzato che la perdita di cellule nel LC è un aspetto specifico del processo patologico della malattia di Alzheimer, piuttosto che essere solamente una conseguenza indiscriminata del danno cerebrale che risulta nella demenza, anche perchè si è visto che pazienti con demenza da infarti multipli non mostrano una simile perdita neuronale. [Mann et al, 1982]

Invece, per quanto riguarda il coinvolgimento del sistema dopaminergico mesocorticolimbico nello sviluppo dell'AD, si è visto che c'è una diminuzione nella concentrazione di dopamina, sia a livello pre- che post-sinaptico, nella corteccia temporale e nell'ippocampo, di pazienti con questa malattia. [Reinikainen et al, 1990] Inoltre, sembra che la disfunzione di questo sistema, assieme a quella del sistema colinergico, influenzi l'aumento dei depositi di beta-amiloide nel cervello [Itoh et al, 1996] e contribuisca quindi a creare anche deficit di tipo cognitivo. E' importante notare che, in casi di AD, è stato visto che il danno neuronale maggiore è a carico delle cellule dopaminergiche della VTA, mentre quelle della SN risultano meno intaccate. Questa disparità di degenerazione può essere spiegata andando a guardare le regioni che queste strutture innervano. Infatti, la VTA manda efferenza

alle aree corticali prefrontali ed alle strutture limbiche, che come si sa sono quelle in cui le placche senili ed i grovigli neurofibrillari sono presenti in quantità più elevate. Quindi, il danno dei neuroni dopaminergici appartenenti al circuito mesocorticolimbico potrebbe cominciare nelle zone terminali di questi, per poi propagarsi retrogradamente fino al soma. [Mann et al, 1987]

### **1.1.2.2 MODELLI ANIMALI DI AD**

I modelli animali sono essenziali per lo studio delle malattie neurodegenerative, sia per capirne meglio le cause, che per testare e sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Nel caso dell'AD non esiste ancora un modello che presenti tutte le caratteristiche funzionali e istopatologiche tipiche di questa malattia. Tutti i modelli studiati fino ad ora hanno evidenziato delle limitazioni, ma nel loro insieme, ciascuno di essi ha dato un grande contributo alla ricerca sull'AD.

Poche specie animali al mondo sviluppano spontaneamente i disturbi cognitivi ed i sintomi neuropatologici simili a quelli dell'AD nell'uomo, perciò è stato necessario adeguare dei modelli a riprodurre le caratteristiche patologiche della malattia. Ad oggi sono stati introdotti in ricerca modelli di AD basati sul trattamento con farmaci anticolinergici, sull'impiego di lesioni cerebrali chirurgiche o chimiche più o meno selettive ed animali transgenici presentanti le mutazioni che si riscontrano più frequentemente nei pazienti umani. [Dunnett e Barth, 1991]

Di seguito vengono riportati i principali modelli animali studiati fino ad ora.

#### MODELLI FARMACOLOGICI:

I primi modelli di AD che sono stati sviluppati si sono ispirati all'*ipotesi colinergica* [Bartus et al, 1982] ed erano atti a bloccare l'azione dell'acetilcolina (ACh) in ippocampo e in corteccia cerebrale, attraverso la somministrazione di farmaci anti-colinergici, quali ad esempio la scopolamina o l'atropina (che agiscono sui recettori muscarinici inibendo l'azione colinergica), in soggetti sani. [Bartus, 2000] Questi studi, effettuati su modelli murini, scimmie e primati non umani, hanno dimostrato che la somministrazione di antagonisti muscarinici determina deficit di memoria spaziale, associabili a quelli descritti nelle fasi precoci dell'AD [Murphy e Boast, 1985], in numerosi test comportamentali, quali ad esempio il *Radial Arm Maze* ed il *Morris Water Maze* [Buresova et al, 1986]. E' da notare però, che secondo alcune interpretazioni, gli anti-muscarinici non agirebbero direttamente sulla memoria bensì ridurrebbero l'attenzione o la discriminazione degli stimoli, alterando i processi sensoriali, od ancora potrebbero avere effetti sul controllo dei movimenti. [Kirk et al, 1988] Inoltre, i recettori muscarinici sono ampiamente distribuiti in tutto il SNC, per cui è presumibile che inibendoli si intervenga su un ampio spettro di funzioni anatomicamente

poco definibili. E' stato visto, ad esempio che la forma metilata della scopolamina, la quale non passa attraverso la barriera emato-encefalica, appare ridurre comunque le performance in test cognitivi. [Auld et al, 2002]

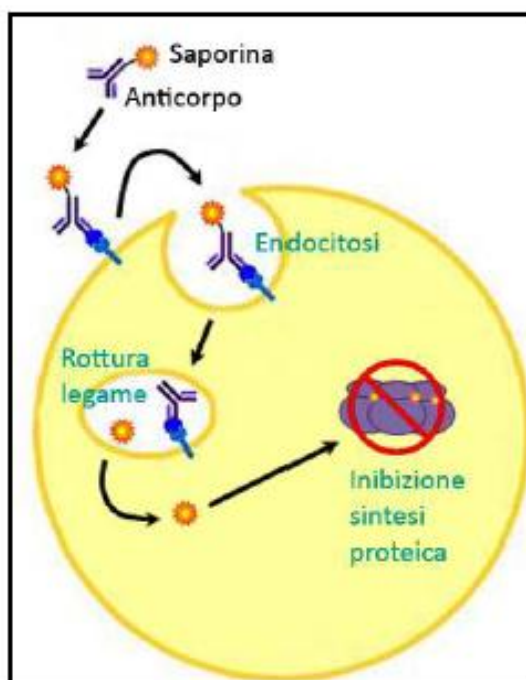
Attualmente i modelli farmacologici sono stati un pò accantonati ed al giorno d'oggi vengono impiegati per lo più nello sviluppo e nello studio di sostanze candidate ad essere incluse nella famiglia dei farmaci dei *cognitive enhancers*.

#### MODELLI LESIVI:

In seguito al fallimento dei *modelli farmacologici* nel testare la validità dell'*ipotesi colinergica* nella patogenesi dell'AD, furono introdotti in ricerca dei *modelli lesivi*. Questi erano basati per lo più sulla distruzione del sistema del prosencefalo di base (comprendente il setto mediale ed il nucleo basale magnocellulare), tramite l'utilizzo di neurotossine, di sostanze eccitotossiche (come ad esempio acido ibotenico, l'acido quisqualico, l'acido kainico), o di lesione elettrolitica dei nuclei colinergici, oppure mediante la rimozione chirurgica degli input colinergici che regolano l'ippocampo (costituiti dal fascicolo fimbria-fornice). [Nilsson et al, 1987] Tali procedure riuscivano ad indurre deficit cognitivi di varia entità negli animali testati tramite test comportamentali, quali ad esempio il *Morris Water Maze*, il *passive avoidance* ed il *delayed non-matching-to-position*. [Miyamoto et al, 1985 e 1987; Dunnett et al, 1991; Fibiger, 1991] Numerose furono però le critiche verso tali procedure, poichè presentavano scarsa selettività, dato che risultava evidente che gli effetti funzionali di tali lesioni non erano dovuti solamente alla morte dei gruppi neuronali di interesse (colinergici), ma anche al danno neuronale a carico di sistemi neuronali adiacenti. [Fibiger, 1991] Per questo motivo la ricerca si è indirizzata verso *modelli di lesione* più selettivi ed efficienti, quale si è rivelato ad esempio essere l'impiego di neurotossine. Infatti, partendo dall'osservazione che i neuroni colinergici del prosencefalo basale esprimono in maniera selettiva il recettore a bassa affinità per il *Nerve Growth Factor* (NGF) p75NTR [Batchelor et al, 1989; Yan e Johnson, 1989], si è arrivati a sviluppare l'immunotossina 192-IgG-saporina, che ha rappresentato uno strumento senza precedenti nello studio del ruolo di tali neuroni nei meccanismi di apprendimento e memoria. [Wiley et al, 1991; Book et al., 1992; Nilsson et al, 1992; Heckers et al, 1994; Leanza et al, 1995]

Questa molecola è formata da una proteina di origine vegetale, la saporina (dal nome della pianta che la produce: la *Saponaria Officinalis*), coniugata ad un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore p75NTR (l'immunoglobulina 192). La saporina fa parte della famiglia delle proteine inattivanti i ribosomi di tipo I (RIP-I) ed è in grado di determinare rapida morte cellulare legandosi alla subunità ribosomiale 60s ed inibendo in maniera irreversibile la sintesi proteica. [Stirpe et al, 1992; Contestabile e Stirpe, 1993] La saporina di per sé non ha un elevato grado di tossicità, in quanto non è in grado di attraversare la

membrana fosfolipidica cellulare. Se però viene somministrata coniugata con l'anticorpo 192-IgG, selettivo per il recettore p75NTR, è in grado di penetrare nella cellula grazie al legame risultante tra anticorpo-recettore e l'internalizzazione di questo complesso nella cellula. Questo complesso viene poi trasportato per via retrograda al soma, dove la saporina viene liberata determinando il blocco ribosomiale e la conseguente morte neuronale. [Thomas et al, 1991; Wiley, 1991] (Fig. 1.6)



**Fig. 1.6:** Meccanismo d'azione delle immunotossine coniugate a saporina.

*L'anticorpo si lega in modo specifico ad un antigene espresso sulla superficie cellulare, il complesso viene internalizzato e la tossina inibisce la sintesi proteica provocando la morte cellulare.*

Numerosi studi condotti in ratto riportano come tale composto, somministrato direttamente nel parenchima cerebrale, riconosce in maniera selettiva le cellule colinergiche del prosencefalo basale [Torres et al, 1994], mentre se somministrato via intracerebroventricolare (ICV) determina anche una discreta perdita nel numero di cellule del Purkinje nel cervelletto, in quanto nel ratto adulto esprimono anch'esse il recettore p75NTR. [Pioro e Cuello, 1988; Leanza et al, 1995; Waite et al, 1995] Ad ogni modo, la somministrazione intraventricolare della tossina non influisce sui neuroni non colinergici contigui alle zone di iniezione [Leanza et al, 1995 e 1996], né tantomeno sui neuroni colinergici che proiettano all'amigdala, in quanto questi non esprimono il recettore p75NTR. [Heckers et al, 1994]

Nei numerosi studi che hanno utilizzato quest'immunotossina, è stato osservato che la perdita selettiva e dose-dipendente dei neuroni colinergici del MS e NBM, si associava ad una massiva deafferenzazione colinergica delle regioni target, quali la neocorteccia e la formazione ippocampale. I deficit indotti in test di apprendimento e memoria invece sono

risultati essere molto ridotti rispetto a quelli che venivano riscontrati utilizzando sostanze meno selettive. [Nilsson et al, 1992; Torres et al, 1994; Berger-Sweeney et al, 1994; Leanza et al, 1995] Un altro dato importante ricavato da questi modelli lesivi è costituito dall'ossevezione che, in ratti a cui veniva effettuata una lesione mediante somministrazione di 192-IgG saporina, la produzione di APP aumentava [Leanza, 1998], ed era riportata a livelli normali dopo la somministrazione di agonisti muscarinici [Lin et al, 1998] od in seguito al trapianto di cellule colinergiche embrionali [Aztiria et al, 2009]; suggerendo comunque un ruolo importante del sistema colinergico nella patogenesi dell'AD.

Prese nel loro insieme, tali evidenze indicano che la 192-IgG saporina può essere considerata come una delle migliori sostanze da impiegare in protocolli di lesione del sistema colinergico del prosencefalo di base, poichè riesce ad essere estremamente selettiva ed a riprodurre dei segni istopatologici associabili all'AD. Tuttavia si pensa che la perdita dei neuroni colinergici del prosencefalo di base potrebbe non essere sufficiente a determinare deficit cognitivi rilevanti; perciò un modello che provi a replicare i problemi di apprendimento e memoria tipici della AD dovrebbe prevedere l'induzione non solo di lesioni colinergiche, ma anche la produzione delle altre lesioni multi-sistemiche riscontrate nella patologia. [Marien et al, 2004]

A questo scopo, nel corso degli anni, sono state introdotte altre immunotossine, come ad esempio l'anti-dopamina beta-idrossilasi saporina (anti-DBH-sap), che agisce selettivamente sui neuroni noradrenergici del complesso *Locus Coeruleus e Sub-Coeruleus* (LC/SubC). [Milstein et al, 2007] Questi neuroni infatti esprimono selettivamente l'enzima dopamina-beta-idrossilasi, che è implicato nella produzione di noradrenalina. Questo enzima (DBH) si può trovare sia nel citoplasma che sulla membrana cellulare. [Sabban et al, 1983] In particolare, l'enzima viene esposto nell'ambiente extracellulare quando le cellule sono in attività e liberano noradrenalina. [Weinshilboum e Axelrod, 1971], permettendo in questo modo il legame con la parte anticorpale dell'immunotossina in questione. L'anti-DBH-sap infatti, come la 192-IgG-sap, è costituita da un anticorpo (in questo caso un anticorpo monoclonale anti-DBH) e dalla saporina (una proteina inattivante i ribosomi di tipo I), ed appena l'anticorpo si lega alla forma dell'enzima DBH esposta in membrana il complesso risultante viene endocitato e trasportato fino al corpo cellulare, dove la saporina esercita la sua funzione tossica [Silver e Jacobowitz, 1979]. Il suo meccanismo d'azione è quindi identico a quello della 192-IgG-sap che è stato precedentemente descritto. (Fig. 1.6)

#### MODELLI TRANSGENICI:

I principali modelli transgenici di AD presentano come base di partenza l'*ipotesi amiloide* oppure quella della *tau-fosforilata*. Infatti, nel genoma di questi animali vengono inseriti dei costrutti che determinano la sovra-espressione di APP oppure delle mutazioni, analoghe a quelle che nell'uomo provocano FAD, nei geni codificanti per le preseniline 1 e 2

(PS1 e PS2) [Duyckaerts et al, 2008], od ancora mutazioni a carico del gene MAPT (codificante per la proteina Tau). [Lewis et al, 2000 e 2001; Oddo et al, 2003] Sebbene questi modelli riescano a sviluppare delle caratteristiche patologiche che possono essere ricondotte all'AD (quali depositi di beta-amiloide, strutture simili ai grovigli neurofibrillari, astrocitosi e microgliosi reattiva), non sempre queste sono associate a perdita neuronale o a deficit cognitivi. [Frautschy et al, 1998]

Un altro modello di studio prende in considerazione l'importanza del fattore di crescita neuronale (NGF) nello sviluppo dell'AD. In particolare è stato sviluppato un animale transgenico che esprime un anticorpo ricombinante che neutralizza l'NGF. Qualche tempo dopo la nascita in questi animali si nota una degenerazione colinergica progressiva, dovuta alla mancata esposizione dei neuroni colinergici all'NGF, da cui dipende la loro crescita ed innervazione. Inoltre, in questi animali è osservabile un deterioramento cognitivo simile a quello presente nei pazienti affetti da AD. [Capsoni et al, 2000]

### **1.1.2.3 APPROCCI TERAPEUTICI**

Nonostante l'AD sia una delle patologie più studiate, al momento non esistono cure per questa malattia ed i trattamenti farmacologici sperimentati fino ad ora riescono ad ottenere solo dei modesti miglioramenti sintomatici. Questo molto probabilmente è dovuto al fatto che ad oggi il processo patogenetico di questa malattia non è del tutto compreso.

I farmaci che sono attualmente in commercio possono essere distinti in base ai differenti target su cui vanno ad agire, per lo più sono mirati al rallentamento della progressione della degenerazione neuronale oppure al miglioramento delle prestazioni cognitive.

In particolare, i farmaci che hanno come obiettivo il rallentamento della progressione della malattia cercano d'intervenire sulla presunta tossicità della beta-amiloide (tentando di inibirne la produzione, aumentarne la degradazione o impedirne l'aggregazione) [Kisilevsky et al, 2004; Wang et al, 2004], oppure sugli effetti dello stress ossidativo (incrementando l'assunzione di vitamine), od ancora cercando di ridurre l'eccitossicità da glutammato (utilizzando antagonisti glutammatergici quali la memantina) [van Marum, 2008] ed i processi infiammatori tipici dell'AD. [Cummings, 2004] Nessuno di questi trattamenti però, una volta introdotto nella sperimentazione clinica, ha portato a dei risultati efficienti.

L'altro gruppo di farmaci, che cerca di migliorare i sintomi cognitivi, si basa per lo più sull'utilizzo degli inibitori dell'acetilcolinesterasi, l'enzima responsabile della degradazione della acetilcolina, in modo da prolungare la disponibilità di questo neurotrasmettitore e la sua azione sinaptica. I farmaci appartenenti a questa categoria che vengono usati maggiormente nella pratica clinica sono la tacrina, il donepezil, la rivastigmina e la galantamina [Cummings, 2004; van Marum, 2008]; ma nonostante la loro grande diffusione



queste sostanze sono solo modestamente efficaci (molto probabilmente perchè prendono in considerazione solamente uno dei tanti sistemi coinvolti in questa patologia) ed inoltre non sono prive di effetti collaterali.

### **1.1.3 La malattia di Parkinson**

La malattia di Parkinson (PD) è una malattia neurodegenerativa idiopatica, non-ereditaria, cronica e progressiva, che colpisce l'1% della popolazione mondiale sopra i 60 anni. [von Campenhausen et al, 2005]

Fu descritta per la prima volta nel 1817 dal dottor James Parkinson e clinicamente è caratterizzata da tremori a riposo, bradicinesia (lentezza nell'esecuzione dei movimenti), acinesia (difficoltà nell'iniziare i movimenti), rigidità e squilibrio posturale. La presenza di questi sintomi motori è il risultato della perdita della trasmissione dopaminergica nello striato, in seguito alla progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici presenti nella *substantia nigra* (SN). [Fahn et al, 1971]

Oltre ai sintomi motori nel PD ci può essere anche la concomitante presenza di sintomi non-motori, quali: depressione, ansietà, deficit cognitivi, disturbi neuropsichiatrici, disfunzioni del sistema autonomo, disturbi del sonno e sintomi sensoriali. [Borek et al, 2006] La causa di questi sintomi è ancora ampiamente da indagare.

#### **1.1.3.1 FISIOPATOLOGIA**

Come è stato accennato, il PD è caratterizzato prevalentemente dalla perdita dei neuroni dopaminergici nella *substantia nigra*, e dalle rispettive efferenze nigro-striatali. Quando il contenuto di DA nello striato è ridotto dell'80% e viene perso il 50-60% dei corpi cellulari dopaminergici iniziano a comparire i sintomi motori tipici della patologia. [Agid, 1991]

Oltre alla perdita dei neuroni dopaminergici nigrali, un'altra caratteristica tipica del PD è costituita dalla presenza di aggregati di alfa-sinucleina ( $\alpha$ -syn) nelle inclusioni intracitoplasmatiche chiamate corpi di Lewy (LB), e la cui presenza è stata trovata anche nei neuriti di Lewy (LN) dei processi distrofici. [Spillantini et al, 1997; Baba et al, 1998]

Nel 2003, Braak e collaboratori hanno descritto il processo patologico che associa la deposizione di aggregati di alfa-sinucleina con la progressione del PD, notando che questi accumuli di proteine appaiono inizialmente nel nucleo vagale motorio dorsale del tronco encefalico, per poi progredire verso le strutture limbiche del mesencefalo, fino a raggiungere le aree corticali durante gli ultimi stadi della malattia. [Braak et al, 2003 e 2004] Questi aggregati proteici sono associati all'aumento di morte cellulare che coinvolge prevalentemente i neuroni dopaminergici del mesencefalo. [Mosharov et al, 2009]

Benchè la maggior parte dei pazienti presenta un PD idiopatico non-ereditario, in una minoranza (il 5% dei casi) sono state trovate delle mutazioni associabili all'eziogenesi della malattia. Tra questi geni mutati troviamo in particolare: quello che codifica per l'alfa-sinucleina (SNCA), quello della parkina (PRKN), quello dardarina (LRRK2), quello della kinasi-1 putativa indotta da PTEN (PINK1) e quello di DJ-1. [Lesage e Brice, 2009]

I deficit cognitivi associati al PD, hanno un esordio piuttosto precoce nel corso della malattia e coinvolgono circa il 25% dei pazienti. [Muslimovic et al, 2005] Questi disturbi sono caratterizzati da perdita di memoria e di attenzione, da problemi nelle funzioni esecutive (quali i processi mentali necessari ad adattarsi ad un ambiente nuovo, la pianificazione, il problem solving od il processamento di informazioni importanti). [Bosboom et al, 2004] La demenza invece arriva durante le fasi tardive della malattia e coinvolge l'83% dei pazienti. Inoltre, da studi neuropatologici è stato visto che la presenza di LB e LN in corteccia correlata in modo molto forte alla presenza di demenza. [Mattila et al, 2000]

Dato che la perdita dei neuroni dopaminergici della SN è correlata direttamente alla gravità dei sintomi motori, è stato ipotizzato che invece, i sintomi non-motori (inclusi i deficit cognitivi e la demenza) potrebbero essere causati dalla disfunzione di altri sistemi neuronali. Infatti, in pazienti affetti da PD è stata riscontrata una perdita del 26% di neuroni dopaminergici dell'area tegmentale ventrale (VTA), e nella stessa area, anche di neuroni non-dopaminergici. [McRitchie et al, 1997] Inoltre, altri studi riportano il coinvolgimento di altri sistemi neurotrasmettitoriali nella malattia, come documenta la perdita di neuroni colinergici del *prosencefalo basale* [Nakano e Hirano, 1984; Perry et al, 1985], di neuroni noradrenergici nel *Locus Coeruleus* [Chan-Palay, 1991] e di quelli serotoninergici nel *nucleo del rafe*. [Halliday et al, 1990] Quindi, sulla base di queste osservazioni di perdita neuronale extra-nigrale, tratte da pazienti *post-mortem*, sono state proposte diverse ipotesi per correlare i disturbi cognitivi presenti nel PD con la disfunzione di specifici sistemi neurotrasmettitoriali. Qui di seguito ne riportiamo qualcuna.

#### L'IPOTESI DOPAMINERGICA:

Lo striato fa parte, anatomicamente e funzionalmente, del circuito cortico-striato-pallido-talamo-corticale, in cui il nucleo caudato riceve le proiezioni provenienti dalla parte dorso-laterale della corteccia prefrontale (PFC), una regione cerebrale implicata nelle funzioni esecutive e nella cognizione, e che proietta a sua volta al globo pallido. Questa area proietta al talamo, il quale manda efferenze di ritorno alla PFC. [Alexander et al, 1986] La perdita di neuroni dopaminergici nella SN, che proiettano allo striato, potrebbe quindi andare ad intaccare il circuito fronto-striatale, provocando danni a livello delle funzioni esecutive. E' stato visto anche da studi sperimentali che l'ipofunzione dopaminergica dello striato causa

deficit cognitivi, in particolare per quanto riguarda la memoria verbale e visiva, ma non invece in compiti attentivi. [Jokinen et al, 2009]

La deplezione dell'innervazione dopaminergica nella corteccia, risultante dalla perdita di neuroni dopaminergici nella VTA, può anch'essa distruggere il circuito prefrontale dorso-laterale e causare deficit in test cognitivi, come si è visto attraverso studi di imaging con risonanza magnetica funzionale in pazienti di PD. [Mattay et al, 2002]

Un'altra evidenza a supporto dell'importanza dell'integrità della trasmissione dopaminergica nei processi di cognizione è stata fornita da studi sulla funzionalità dopaminergica della corteccia cingolata anteriore, dello striato ventrale (due regioni che ricevono input dopaminergici sia dalla VTA che dalla SN mediale) e del nucleo caudato in pazienti affetti da PD con demenza e senza. Si è visto infatti che il declino di funzionalità di queste aree è associato alla comparsa di demenza. [Ito et al, 2002]

Alcune capacità cognitive invece sembrano essere indipendenti dal sistema dopaminergico, come ad esempio la memoria a breve termine, l'attenzione selettiva visiva o la pianificazione; poichè queste rimangono deficitarie anche dopo che ai pazienti di PD viene somministrata la levodopa (il precursore della dopamina). [Pascual-Sedano et al, 2008] Questo suggerisce che parte delle disfunzioni cognitive del PD potrebbero coinvolgere meccanismi non-dopaminergici. [Bosboon et al, 2004]

#### L'IPOTESI COLINERGICA:

Nella malattia di Parkinson, oltre all'evidente riduzione dopaminergica, si è osservata anche una concomitante disfunzione della neurotrasmissione colinergica. [Candy et al, 1983; Whitehouse et al, 1983; Nakano e Hirano, 1984; Tagliavini et al, 1984] Per questo motivo, l'ipotesi colinergica della disfunzione mnemonica geriatrica formulata da Bartus nel 1982 oltre all'AD viene anche associata al PD. Come descritto in precedenza, quest'ipotesi collega i sintomi cognitivi delle due malattie alla drammatica perdita colinergica che avviene nel *prosencefalo basale*. [Bartus et al, 1982] Sia nel PD che nell'AD, è infatti presente un decremento di neuroni colinergici, nel *nucleo basale di Meynert* e nel *setto mediale*, che correla alla gravità dei deficit cognitivi; suggerendo un coinvolgimento di questo sistema nelle capacità di apprendimento e memoria. [Whitehouse et al, 1982]

Altre evidenze della presenza di una disfunzione che coinvolge il sistema colinergico anche in pazienti affetti da PD, sono date dall'analisi dei livelli corticali di ChAT e di acetilcolina esterasi (AChE), che in questi casi risultano ridotti. [Dubois et al, 1983] In particolare, da uno studio post-mortem, si è visto che c'è un decremento maggiore nei livelli di AChE nelle cortecce frontali di pazienti di PD con demenza (-68%) rispetto a quelli non-dementi (-35%) [Ruberg et al, 1986], rafforzando l'idea di un coinvolgimento colinergico nello sviluppo dei sintomi non-motori di questa malattia.

In casi di PD, oltre alla perdita degli enzimi caratteristici dell'attività colinergica, si è notata anche la riduzione dei recettori muscarinici e nicotinici nella *substantia nigra pars compacta*, nell'*ippocampo* e nella *neocorteccia*. [Ruberg et al, 1982; Lange et al, 1993]

Inoltre, Braak e collaboratori hanno osservato in pazienti affetti da PD, la deposizione di aggregati proteici costituiti da alfa-sinucleina nei neuroni colinergici del *prosencefalo di base*, concomitanti alla presenza di corpi di Lewy e perdita neuronale nella *substantia nigra*. [Braak et al, 2003] Il grado di questi accumuli, non correla però con la comparsa dei deficit cognitivi, che invece sembrano più associati alla perdita colinergica. [Perry et al, 1985; Mattila et al, 2001]

In conclusione, a seguito di tutte queste osservazioni, sembra chiaro che la degenerazione del sistema colinergico del *prosencefalo di base*, svolge un ruolo importante nel declino cognitivo riscontrato in pazienti affetti da PD. [Korczyn, 2001]

#### L'IPOTESI NORADRENERGICA:

Questa ipotesi ritiene che l'integrità del *Locus Coeruleus* possa essere importante per facilitare o mantenere l'attività delle vie dopaminergiche nigrostriatali e mesolimbiche. Si basa su studi anatomici, elettrofisiologici, neurochimici e comportamentali condotti in animali modello, tramite i quali è stato visto che la perturbazione del sistema noradrenergico va nel contempo ad alterare anche diversi indici della neurotrasmissione dopaminergica. [Marien et al, 2004] Infatti, quando il sistema dopaminergico risulta danneggiato, si è visto che il sistema noradrenergico cerca di compensare questa disfunzione aumentando la sua attività. [Delaville et al, 2011] Tuttavia in pazienti di PD con demenza si è osservata una drastica diminuzione dei neuroni noradrenergici e della concentrazione di noradrenalina (-80%) nel cervello [Chan-Palay e Asan, 1989; Gaspar et al, 1991] In questi casi, la perdita di entrambi i tipi di innervazione (sia dopaminergica che noradrenergica) nelle strutture limbiche, è associata a problemi comportamentali e cognitivi, tra cui la comparsa di demenza, e deficit di attenzione. [Riekkinen et al, 1998]

#### **1.1.3.2 MODELLI ANIMALI DI PD**

I modelli *in vivo* di PD cercano di comprendere quanti più aspetti della malattia possibili e nel corso degli anni ne sono stati usati di diversi tipi. Esistono modelli farmacologici, lesivi o genetici di PD, ma nessuno di questi riesce a riprodurre collettivamente ed appieno tutte le caratteristiche cliniche (sintomi come acinesia, rigidità), patofisiologiche (danno da stress ossidativo, infiammazione, inibizione del complesso I, ubiquitinazione del proteosoma), morfologiche (degenerazione del tratto nigro-striatale e deposizione di corpi di Lewy) e biochimiche (riduzione della dopamina striatale) di questa patologia. [Jackson-Lewis et al, 2012]

Ogni modello va quindi selezionato in base a quali aspetti della malattia ci si pone d'indagare. In particolare agli scopi di questo lavoro di tesi abbiamo scelto un modello che ne riproducesse i sintomi cognitivi. Qui di seguito invece vengono ricapitolati alcuni esempi di modelli animali usati fino ad ora nell'indagine scientifica nell'ambito della malattia di Parkinson.

#### MODELLI FARMACOLOGICI:

Tra i più noti modelli farmacologici di PD usati in ricerca troviamo quelli che si basano sulla somministrazione della reserpina o dell'aloiperidolo in roditori. Gli animali trattati con queste sostanze infatti mostrano alcuni disturbi motori peculiari del PD, (quali tremore, rigidità ed ipocinesia), che possono essere revertiti dal trattamento con L-DOPA. [Duty e Jenner, 2011]

In particolare, la reserpina blocca l'immagazzinamento delle amine biogene (dopamina, noradrenalina e serotonina) nelle vescicole sinaptiche, andando ad alterare la trasmissione monoaminergica ed inducendo i sintomi motori della malattia, ma al contempo non produce effetti sul versante della degenerazione dei neuroni dopaminergici. [Colpaert, 1987]

L'aloiperidolo invece agisce come antagonista dei recettori dopaminergici D2, ed in minor estensione anche di quelli D1, espressi sui neuroni che costituiscono la via diretta ed indiretta del circuito motorio. Il blocco della trasmissione dopaminergica striatale risulta in una diminuzione del firing dei circuiti dei gangli della base e provoca rigidità motoria e catalessi. [Sanberg, 1980]

Altri modelli sviluppati comprendono quelli che utilizzano gli inibitori del proteosoma (PSI) oppure composti che provocano infiammazione tipo il lipopolisaccaride (LPS). [Dutta et al, 2008]

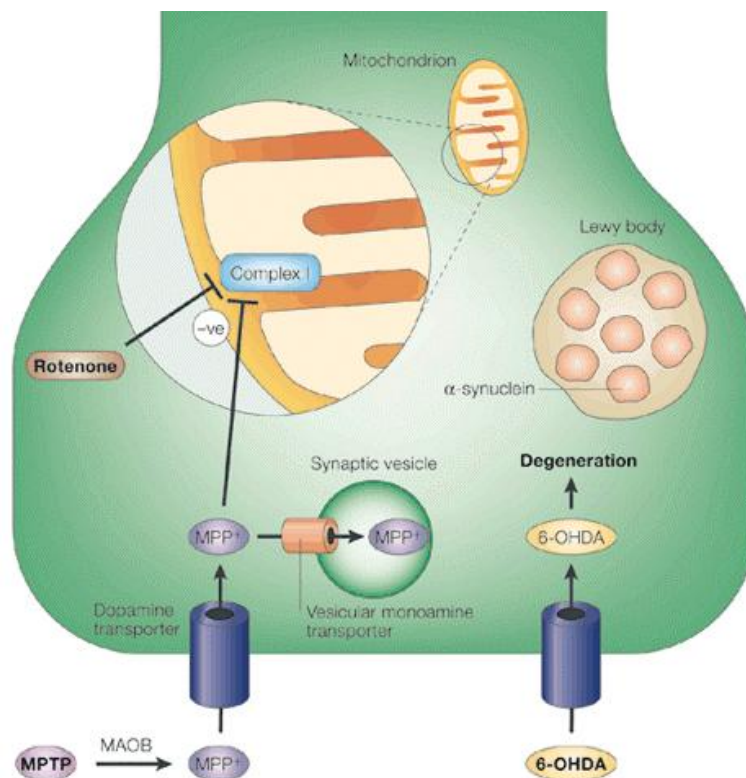
Nonostante questi modelli abbiano avuto grande importanza per la scoperta di nuovi farmaci sintomatici per il PD, presentano però delle limitazioni. Ad esempio i loro effetti sono temporanei e ciò limita molto la loro utilità per studiare gli effetti di sostanze nel lungo termine; inoltre non possono essere utilizzati per indagare nuove strategie di neuroprotezione o di riparazione cellulare.

#### MODELLI LESIVI:

A questo gruppo appartengono i modelli animali di PD più usati e studiati. Attraverso l'uso di specifiche tossine è infatti possibile riprodurre una delle principali caratteristiche anatomiche e patologiche della malattia di PD, che consiste nella degenerazione dei neuroni dopaminergici.

Le tecniche di lesione che fin'ora hanno dato i migliori risultati sono state ottenute in roditori e consistono nell'iniezione stereotassica unilaterale in SN o nella *banda mediale del*

*prosencefalo* della neurotossina 6-idrossidopamina (6-OHDA), in modo da riprodurre un modello emi-parkinsoniano in cui la via dopaminergica nigro-striatale viene distrutta [Silverman, 1993], e nella somministrazione sistemica del composto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), inibitore del complesso I mitocondriale, che causa la morte dei neuroni dopaminergici. [Langston e Ballard, 1984; Langston, 1987]



**Fig. 1.7:** La disfunzione mitocondriale ed il danno ossidativo rappresentano i due principali meccanismi attraverso cui le neurotossine inducono la morte dei neuroni dopaminergici.

Nello specifico, la 6-OHDA viene portata all'interno della cellula tramite il trasportatore della dopamina ed una volta dentro genera radicali liberi. Il MPTP invece è convertito dalla monoammina ossidasi B (MAOB) a MPP+ (1-metil-4-fenilpiridinum), che attraverso il trasportatore della dopamina si accumula nei mitocondri andando ad inibire il complesso I e causando apoptosi. Lo stesso identico effetto è causato anche dal rotenone. Inoltre, si è visto che entrambi questi composti aumentano l'espressione dell'alfa-sinucleina, che a sua volta contribuisce alla formazione dei corpi di Lewy, caratteristica peculiare del PD. [Beal, 2001]

La tossina 6-OHDA provoca danno neuronale inducendo processi di stress ossidativo e causando la morte delle cellule dopaminergiche in maniera dose-dipendente. [Ungerstedt, 1971] Questa tossina infatti presenta una struttura analoga a quella della dopamina, ed un'elevata affinità per il trasportatore di questa monoammina, il quale rappresenta quindi la via d'ingresso preferenziale di questa sostanza nei neuroni. Una volta entrata nelle cellule, la 6-OHDA si accumula nel citoplasma e va incontro ad auto-ossidazione, con concomitante formazione di radicali liberi. [Schober, 2004] Gli animali lesionati con questa neurotossina mostrano asimmetria posturale (tendono a girare in senso ipsilaterale rispetto al lato

lesionato), discinesia e deficit cognitivi, specialmente nei compiti in cui è richiesto l'impiego della working memory. [Perez et al, 2009]

Il modello che si basa sull'impiego della neurotossina MPTP, sembra essere uno dei più pertinenti in quanto a riprodurre gli aspetti patologici del PD. Si è visto che animali trattati con questa sostanza presentano perdita di neuroni dopaminergici nel *nucleo caudato*, nel *putamen*, nella *substantia nigra* ed in altre regioni sottocorticali del tronco cerebrale [Mavridis et al, 1991]; ed in minor estensione anche di neuroni noradrenergici e serotoninergici nelle stesse zone. [Pifl et al, 1991] Inoltre, c'è un'aumento nell'espressione dell'alfa-sinucleina e della sua aggregazione nei corpi di Lewy. [Beal, 2001] Gli effetti motori provocati sugli animali rispecchiano egregiamente quelli riscontrati sui pazienti umani.

Altri modelli, che si basano sulla degenerazione del tratto nigro-striatale, includono quelli in cui vengono somministrati in modo sistemico pesticidi, quali il rotenone ed il paraquato, poichè si pensa che questi possano aumentare il rischio di sviluppare il PD. [Dawson et al, 2002; Duty e Jenner, 2011] (Fig. 1.7)

Molti di questi modelli sono stati utili per capire alcuni aspetti della patogenesi del PD, tuttavia non sono adatti per lo studio di terapie farmacologiche atte a curare la malattia.

#### MODELLI TRANSGENICI:

Dato che il 10% dei casi di PD possono essere associati a cause genetiche, sono stati sviluppati dei modelli animali che riproducono alcune delle maggiori mutazioni riscontrate nei pazienti umani.

In particolare, si è andati ad agire sull'espressione dell'alfa-sinucleina (principale componente dei LB trovati nel tessuto cerebrale di PD) [Chesselet, 2008; Blandini e Armentero, 2012] e sono state effettuate delle alterazioni nei geni coinvolti nella via di ubiquitinazione del proteosoma (come ad esempio quelli codificanti per parkina e DJ-1). [McNaught et al, 2002]

Tuttora però, nonostante sia stata fatta più chiarezza sulle vie biochimiche su cui intervengono tali mutazioni, non si è riusciti a comprendere se la presenza degli aberranti aggregati proteici che ne conseguono, sia la causa o l'effetto del processo neurodegenerativo che caratterizza la malattia di Parkinson. [Blandini e Armentero, 2012] Anche perchè, pur esprimendo le inclusioni proteiche, nessuno di questi modelli transgenici presenta neurodegenerazione.

#### **1.1.3.3 APPROCCI TERAPEUTICI**

Nonostante l'estenuante ricerca associata al PD, ad oggi non esistono ancora cure per questa malattia. Il miglior trattamento disponibile è costituito dalla terapia dopaminergica di *replacement*, che però è in grado soltanto di alleviare i sintomi motori. Questa strategia

terapeutica è basata essenzialmente sull'assunzione di farmaci, come la levodopa (L-DOPA, precursore della DA) o gli agonisti dopaminergici, o gli inibitori degli enzimi di degradazione di questa monamina, che cercano di correggere la deficienza dopaminergica. [Katzenschlager e Lees, 2002; Smith et al, 2012]

## **1.2 IL SUBSTRATO ANATOMICO DELLA MEMORIA**

Il cervello è una struttura fisiologica complessa e costituisce la sede dove hanno luogo le funzioni cognitive. Fa parte del sistema nervoso centrale (SNC) ed è costituito da cellule nervose interconnesse tra loro in reti, coinvolte negli scambi d'informazioni necessari per l'attuazione delle funzioni comportamentali.

Studiando l'attività dei neuroni, si è notato che, ad ogni diversa facoltà cognitiva e locomotoria, corrisponde un incremento di attività in particolari aree del cervello. Da ciò è derivata l'ipotesi che il cervello abbia una struttura modulare e che ogni modulo sia specializzato per un certo tipo di attività. Oggi sappiamo che gruppi di neuroni differenti assolvono ruoli funzionali diversi, e che le diverse aree cerebrali sono tra loro interconnesse in modo da formare sistemi di ordine superiore più complessi. [Gazzaniga et al, 2005]

Studi di anatomia comparata sono stati molto importanti per capire le basi di come determinate strutture e funzioni cerebrali sono correlate alle abilità di apprendimento e memoria. Infatti, anche se i sistemi nervosi delle varie specie animali presentano tra loro grandi differenze, la maggior parte di ciò che sappiamo per quanto riguarda le basi neurali delle funzioni cognitive deriva proprio da studi sugli animali piuttosto che da quelli sugli umani. Ciò è stato possibile poiché molti aspetti del cervello di un ratto, o di una scimmia, o persino di un insetto, sono sufficientemente simili a quello umano da poterne fare dei correlati.

Tra le aree che sono state viste essere coinvolte nel processamento e nella regolazione dell'apprendimento e della memoria si possono annoverare:

- parte del sistema limbico (come la formazione ippocampale e l'amigdala);
- la corteccia prefrontale;
- il prosencefalo basale;
- i nuclei dopaminergici del mesencefalo.

Riuscire a capire l'interazione tra questi sistemi neurali potrebbe avere implicazioni terapeutiche per tutte quelle malattie che ne presentano disfunzione, come è il caso ad esempio del PD e dell'AD. [Levin, 2006]



### 1.2.1 L'ippocampo

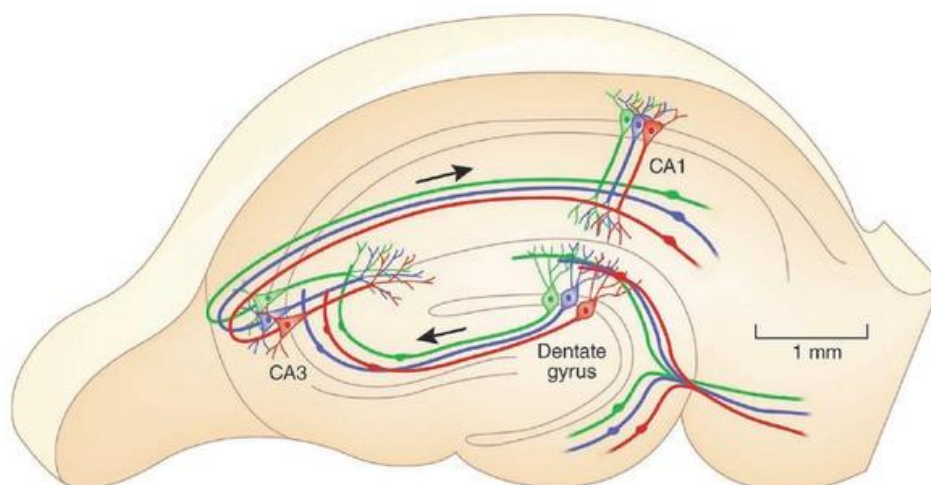
L'*ippocampo* è una delle strutture anatomiche più importanti in ambito di memoria. Fa parte del *sistema limbico*, i cui componenti si trovano all'interno del *lobo temporale*, a livello sottocorticale del prosencefalo e delle aree mesencefaliche.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'*ippocampo* è la sede d'interazione tra i sistemi di percezione e di memoria, con un ruolo particolare nella memoria spaziale. Esiste una sorta di lateralizzazione delle funzioni e delle risposte a livello degli ippocampi, in particolare: l'*ippocampo* destro si attiva nei processi di apprendimento ambientale; mentre l'*ippocampo* sinistro è connesso con la memoria verbale. Inoltre, è una struttura cerebrale strettamente connessa al consolidamento delle informazioni.

Riceve *input* colinergici e GABAergici dal *medial septum* (MS) attraverso la via setto-ippocampale [Naumann et al, 1992] ed afferenze da parte del talamo [Herkenham, 1978], dalla regione sopramammillare [Haglund et al, 1984] e da gruppi cellulari monoaminergici del tronco dell'encefalo (fibre serotoninergiche dai nuclei del *raphe* mesencefalico, noradrenergiche dal *locus coeruleus* e dopaminergiche dall'*area tegmentale ventrale*). [Nieuwenhuys et al, 2008]

E' sede di importanti fenomeni di plasticità sinaptica legati all'apprendimento e alla memoria, come la Long Term Potentiation (LTP) [Whitlock et al, 2006] e la Long Term Depression (LTD). [Malenka, 1994]

Al suo interno si possono identificare quattro aree: CA1, CA2 e CA3 (dove CA sta per Corno Ammone) ed il *giro dentato* (DG). Le cellule del *giro dentato* (DG) assieme a quelle delle aree CA1 e CA3 sono coinvolte nel *loop trisinaptico*, che rappresenta il maggior circuito ippocampale. (Fig. 1.8)



**Fig. 1.8:** Rappresentazione schematica del loop trisinaptico ippocampale nel ratto. [Moser, 2011]

L'informazione entra nell'*ippocampo* mediante il *tratto perforante*, un fascio di fibre che attraversa lo spazio compreso tra il *subiculum* ed il *giro dentato*, i cui assoni originano da

neuroni glutammatergici che si trovano nel secondo strato della *corteccia entorinale* (EC) e fanno sinapsi a livello dello strato molecolare del DG. Quindi le cellule granulari del DG prendono contatto attraverso le fibre muscoidi (*mossy fibers*) con le cellule piramidali del CA3, i cui assoni proiettano ai dendriti delle cellule in CA1 grazie al fascio collaterale di Schaffer. Dall'area CA1 si dipartono altre fibre che raggiungono il *subiculum*, che è responsabile di tutta l'afferenza all'ippocampo e di tutte le efferenze che escono da questa struttura, inviando assoni alla EC ed ai *corpi mammillari* attraverso il *fornice*, chiudendo quindi il *loop*.

### **1.2.2 La corteccia prefrontale**

Le memorie dopo essere state consolidate vengono depositate nella neocorteccia. Le zone della neocorteccia che sono specializzate nella conservazione a lungo termine delle cognizioni episodiche sono le aree associative dei lobi frontali, in modo particolare la *corteccia prefrontale* (PFC). Soggetti con lesioni in queste aree tendono a dimenticare il modo con cui una certa nozione è stata appresa (amnesia delle origini).

La PFC include quelle regioni della *corteccia frontale* che si estendono anteriormente alle regioni motorie e premotorie dei lobi frontali. [Uylings e van Eden, 1990] Consiste in una rete di interconnessioni di sotto-regioni che mandano e ricevono proiezioni da tutti i sistemi sensitivi e motori, ed anche di alcune strutture sottocorticali. Le porzioni laterali e medio-dorsali della PFC sono associate al processamento delle informazioni sensoriali [Goldman-Rakic e Schwartz, 1982], mentre la PFC mediale è connessa con le strutture limbiche critiche per la memoria ed il processamento degli stati interiori, quali la motivazione e l'affetto [Amaral e Price, 1984] e sembra essere anche coinvolta nel processo dell'inibizione comportamentale. La PFC ventro-laterale svolge un ruolo nel processamento della percezione dei volti e degli stimoli provenienti da oggetti visivi, inoltre integra le informazioni mnemoniche provenienti dalle regioni limbiche [Miller, 2000] ed è importante per il mantenimento dell'attenzione. [Fuster, 2000] La PFC dorso-laterale è invece connessa alle strutture motorie (come le aree supplementari motorie, il cervelletto ed il collicolo superiore) [Lu et al, 1994], regola i comportamenti riflessi [Fuster, 2000] ed è implicata in diversi compiti *working memory*-dipendenti e nella localizzazione di oggetti nello spazio. [Chafee and Goldman-Rakic, 1998]

La PFC inoltre è coinvolta in molte azioni esecutive, che comprendono la *working memory*, l'inibizione comportamentale, l'attenzione e la pianificazione di azioni future.

### **1.2.3 I sistemi di neuromodulazione presi in esame**

I sistemi di neuromodulazione sono costituiti da relativamente piccoli gruppi di neuroni che inviano una moltitudine di assoni a quasi tutte le aree cerebrali. Queste efferenze rilasciano delle sostanze chiamate neuromodulatori, che alterano l'attività neuronale, modulandola, ad esempio agendo sul numero di recettori post-sinaptici disponibili.

Molte malattie umane, tra le quali l'AD e il PD, sembrano coinvolgere un declino generale di questi sistemi di neuromodulazione. [Francis et al, 1999; Marien, 2004]

Qui di seguito vengono descritti quelli presi in esame per questa tesi.

#### **1.2.3.1 IL SISTEMA COLINERGICO DEL PROSENCEFALO DI BASE (BF)**

##### ANATOMIA:

Il principale sistema colinergico del sistema nervoso centrale fa parte di una struttura anatomico-funzionale denominata prosencefalo di base (BF) che innerva la neocorteccia e le regioni ippocampali.

Nel ratto il *prosencefalo di base* è situato nella parte mediale e ventrale degli emisferi cerebrali ed è composto da diversi nuclei neuronali, quali:

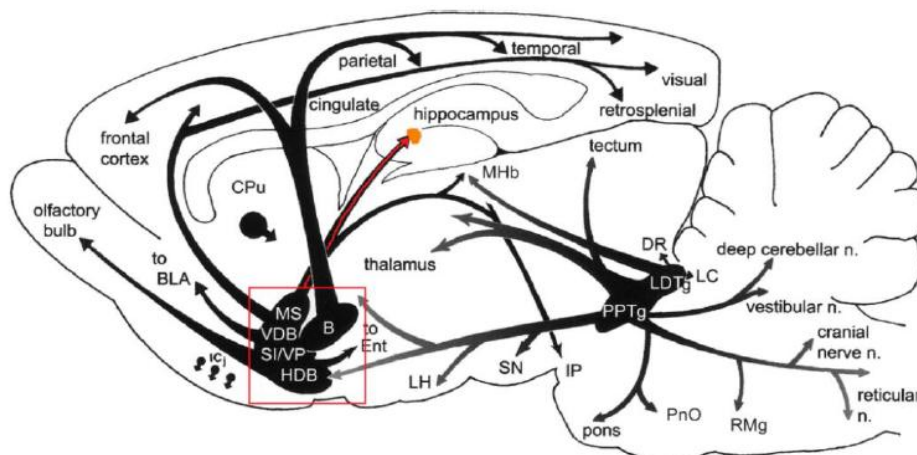
- il *setto mediale* (MS)
- le branche orizzontali e verticali della *banda diagonale di Broca* (hDBB e vDBB)
- il *nucleo basale magnocellulare* (NBM), omologo al *nucleo basale di Meynert* dei primati. [Zaborszky et al, 1997]

Queste aree sono composte da diversi sottotipi neuronali, fra i quali si trovano neuroni colinergici, GABAergici e glutamatergici.

L'insieme dei neuroni colinergici appartenenti a questa struttura costituisce il *sistema colinergico del prosencefalo di base* il quale proietta verso varie strutture limbiche e corticali. [Woolf, 1991] I neuroni del MS rappresentano la parte più rostrale di questo sistema, inviano le loro fibre colinergiche (e GABAergiche) alla *corteccia cingolata ed entorinale*, zone ritenute fondamentali nei processi di memoria ed attenzione, ed inoltre, attraverso la *fimbria* ed il *fornice dorsale*, forniscono le afferenze colinergiche alle zone CA1, CA3 ed al DG dell'*ippocampo*. [Raisman, 1966; Lewis e Shute, 1967] La via setto-ippocampale si ritiene porti le informazioni integrate del tronco encefalico e del sistema limbico che regolano i fenomeni vegetativi di veglia e attenzione. [Alonso e Kohler, 1984] Alle stesse zone proietta anche la vDBB la quale manda alcune fibre anche all'*ipotalamo* ed ai *bulbi olfattivi*, aree innervate anche dall'hDBB. [Mesulam et al, 1983] I neuroni colinergici dei NBM innervano invece in maniera diffusa la *neocorteccia* e l'*amigdala*. [Page e Sofroniew, 1996] (Fig. 1.9) E' da notare che le proiezioni che partono da questa struttura nei primati hanno

un'organizzazione più complessa, probabilmente in relazione alla maggior specializzazione funzionale delle zone da essa innervate.

Il sistema colinergico del *prosencefalo di base* riceve input da altri sistemi neurotrasmettitoriali tra i quali è incluso quello noradrenergico. La noradrenalina e le altre monoamine influenzano il funzionamento di tale struttura, modulando l'attività dei suoi neuroni. [Berridge e Waterhouse, 2003]



**Fig. 1.9:** Rappresentazione schematica delle fibre colinergiche che derivano dal prosencefalo di base (riquadrate in rosso) nel ratto. Il setto mediale (MS) e le branche orizzontali e verticali della banda diagonale di Broca (HDB e VDB) innervano la corteccia cingolata ed entorinale, l'ippocampo, i bulbi olfattivi e l'ipotalamo; mentre il nucleo basale magnocellulare (B) innerva la neocorteccia. [Woolf, 1991]

#### SVILUPPO:

Nel ratto, i neuroni colinergici del *prosencefalo di base* originano secondo un gradiente caudo-rostrale, fra il dodicesimo (E12) e il sedicesimo (E16) giorno dal concepimento; e tra E13 ed E17 migrano attivamente dalla regione germinativa periventricolare fino alle loro destinazioni finali. [Semba e Fibiger, 1988; Brady et al, 1989]

Giunti nelle strutture che occuperanno nella vita adulta, tali cellule incominciano ad esprimere i marker tipici dell'attività colinergica, ossia l'acetilcolinesterasi (AChE) [Eckenstein e Sofroniew, 1983], la colina acetiltransferasi (ChAT) [Armstrong et al, 1987] ed il recettore a bassa affinità per il fattore di crescita neuronale (p75NTR). [Yan e Johnson, 1988]

A partire dallo stadio E15 i neuroni del sistema colinergico basale cominciano ad emettere fibre che, nel periodo perinatale, raggiungono le regioni terminali specifiche dell'*ippocampo* e della *corteccia*. La maturazione delle proiezioni viene però completa solamente verso la quarta settimana post-natale. [Milner et al, 1983; Koh e Loy, 1989] Nello stesso periodo avviene anche la maturazione dei marker colinergici specifici. [Coyle e Yamamura, 1976; Hohmann e Ebner, 1985]

### FUNZIONI:

Il sistema colinergico del *prosencefalo di base* sembra regolare funzioni quali l'attenzione [Sarter e Bruno, 2000], la memoria e l'apprendimento [Nabeshima, 1993; Deiana et al, 2011] che vengono gravemente compromesse in diverse patologie neurologiche quali l'AD, il PD e la schizofrenia. [Dunnett e Fibiger, 1993; Bosboom et al, 2004; Bohnen e Albin, 2011]

Da studi lesivi in modelli animali è stato visto che, per determinare la comparsa di deficit cognitivi apprezzabili, è necessaria una deplezione di neuroni colinergici nel NBM pari all'80-90%, e conseguente riduzione della stessa entità di fibre colinergiche in corteccia ed ippocampo. [Torres et al, 1994; Leanza et al, 1995] Questi dati rispecchiano perfettamente la perdita neuronale osservata nei tessuti di pazienti affetti da AD in seguito ad analisi *post mortem*.

La via setto-ippocampale invece sembra svolgere un ruolo più specifico per quanto riguarda la memoria spaziale. Infatti, da studi sul ratto, si è visto che l'apprendimento spaziale di questi animali, durante il test del radial arm maze, è correlato ai livelli di acetilcolina rilasciati nell'ippocampo dalle fibre colinergiche che derivano dal setto mediale. [Fadda et al, 2000]

Oltre che nelle funzioni cognitive, il sistema colinergico del *prosencefalo di base* sembra essere coinvolto anche nello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC). Infatti, da evidenze sperimentali è emerso che l'acetilcolina svolge un ruolo fondamentale nello stabilire le esatte connessioni sinaptiche all'interno delle reti neurali. [Berger-Sweeney, 1998] Inoltre, un corretto sviluppo temporale dell'innervazione colinergica è fondamentale per la formazione della corteccia cerebrale (in particolare per quanto riguarda la sua citoarchitettura e lo spessore degli strati che la compongono) [Bachman et al, 1994; Ricceri et al, 2002]; anche se non sempre questa alterazione anatomica risulta in deficit cognitivi, poichè ci sono altri sistemi neurotrasmettitoriali, quali ad esempio il noradrenergico ed il dopaminergico, che aumentando la loro attività riescono a compensare queste funzioni. [Leanza et al, 1996]

### **1.2.3.2 IL SISTEMA DOPAMINERGICO DELL'AREA TEGMENTALE VENTRALE (VTA)**

#### ANATOMIA:

La maggior parte dei neuroni dopaminergici è localizzata nel mesencefalo. Lo studio effettuato nel ratto da Dahlstrom e Fuxe [Dahlstrom e Fuxe, 1964] ha permesso di dividere questi neuroni mesencefalici (mes) in tre gruppi principali in base alla loro posizione topografica e di assegnare loro una nomenclatura specifica (dove la lettera "A" sta per aminergico):

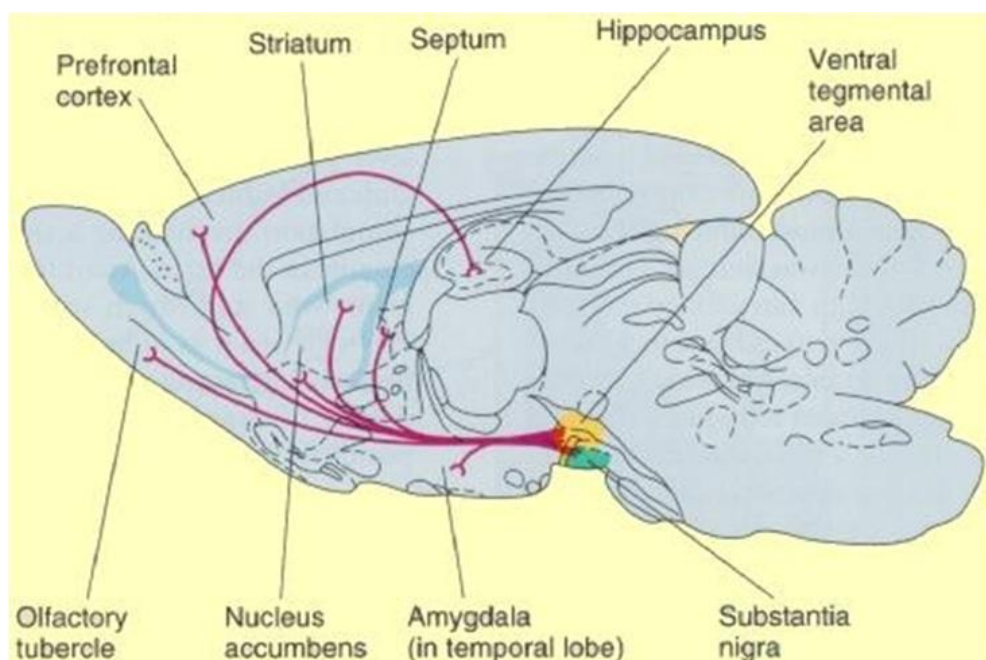
- il gruppo A8, corrisponde al *campo retrorubrale* (RRF),

- il gruppo A9, corrisponde alla *substantia nigra* (SN),
- il gruppo A10, corrisponde all'*aria tegmentale ventrale* (VTA).

In particolare, circa il 95% delle cellule dopaminergiche mesencefaliche sono site nei gruppi A9 e A10. [German e Manaye, 1993] E' da notare però che queste porzioni anatomiche non contengono solo neuroni dopaminergici, infatti sia la VTA che la SN presentano al loro interno anche neuroni GABAergici (35% e 62% rispettivamente) e glutammatergici (3% ed 1% rispettivamente). [Nair-Roberts et al, 2008]

La VTA anatomicamente si colloca dorsalmente e medialmente alla SN. E' costituita da poche decine di migliaia di neuroni dopaminergici nei roditori e qualche centinaio di migliaia nei primati. Nel corso degli anni, in base a criteri citoarchitettionici, è stata suddivisa ulteriormente in sette sottoregioni, quali:

- il *nucleo interfascicolare* (IF),
- il *nucleo lineare rostrale* (RLi),
- il *nucleo lineare centrale* (CLi),
- il *nucleo parapeduncolare* (PaP),
- il *nucleo pigmentato parabrachiale* (PBP)
- il *nucleo paranigrare* (PN)
- il *nucleo VTA vero e proprio*.



**Fig. 1.10:** Rappresentazione schematica dell'innervazione dopaminergica nel ratto.

Studi comparativi tra ratto e uomo hanno mostrato che in entrambe queste specie la VTA occupa una posizione anatomica simile, anche in riferimento alle strutture vicine; mentre

differisce per quanto riguarda la grandezza relativa dei corpi cellulari che la costituiscono. [Halliday e Tork, 1986]

Nel SNC dei vertebrati i neuroni dopaminergici mesencefalici controllano tre importanti circuiti neurali. Il primo è costituito dalla via nigrostriatale che origina dalla *substantia nigra pars compacta* e che innerva prevalentemente lo *striato dorsale* (conosciuto come caudato-putamen) attraverso la banda del prosencefalo mediale. A seguire c'è quello che è definito dalla via mesolimbica, che consiste invece nella VTA e nelle sue proiezioni che raggiungono lo striato ventrale, il nucleo accumbens, l'amigdala, l'ippocampo, il setto laterale, il tubercolo olfattivo, la corteccia entorinale; mentre i neuroni della VTA che inviano le loro efferenze alle strutture corticali, in particolare alla corteccia prefrontale (PFC), costituiscono la via mesocorticale. [Lindvall et al, 1974] Insieme queste due ultime vie costituiscono il sistema dopaminergico mesocorticolimbico che prenderemo in esame in questa tesi. (Fig. 1.10)

#### SVILUPPO:

I neuroni dopaminergici mesencefalici sono generati precocemente durante la neurogenesi, in prossimità della giunzione mesencefalo-romboencefalica [Voorn et al, 1988] e successivamente in direzione ventrale, verso le loro posizioni definitive nella flessura mesencefalica (la SN, la VTA e il campo retrorubrale).

Mediante analisi di immunocitochimica, è stato possibile dimostrare che cellule tirosina idrossilasi (TH) positive, ovvero esprimenti l'enzima determinante per la biosintesi della dopamina, sono presenti nel mesencefalo di topo già verso il nono giorno dello sviluppo embrionale (E9). Queste cellule allo stadio E10 appaiono in migrazione dall'ependima periventricolare verso il mesencefalo ventrale, inoltre il loro numero aumenta e a E10-E11 la loro distribuzione ricorda quella dei gruppi di cellule A9 ed A10 del topo adulto. [Di Porzio et al, 1990]

Nel ratto invece, le cellule TH+ possono essere identificate a partire dallo stadio E12. [Voorn et al, 1988] Intorno a E15-E16 le prime fibre dopaminergiche raggiungono lo striato e la dopamina può essere già rilasciata dalle terminazioni sinaptiche che contattano in questo nucleo. [Fiszman et al, 1991] Alla nascita l'attività dopaminergica costituisce un terzo del livello che raggiungerà in età adulta; aumenta nei primi tre mesi di vita e poi si stabilizza fino a 12 mesi. [Restani et al, 1990]

Nell'uomo, pur presentando una sequenza di eventi di sviluppo simile a quella dei roditori, la durata dell'intero processo è molto più lunga: le cellule TH+ compaiono nel mesencefalo ventrale, vicino alla zona ventricolare, a circa 6,5 settimane di sviluppo fetale; e la loro migrazione ventrale inizia a 6,7 settimane. I neuriti TH+ nel putamen sono invece identificabili a 9 settimane. [Freeman et al, 1991]

**FUNZIONI:**

La dopamina (DA) è coinvolta in molteplici funzioni cerebrali, quali ad esempio la motivazione, i fenomeni di dipendenza, il controllo motorio, l'apprendimento, la working memory, l'attenzione, la modulazione degli stati affettivi ed emotivi ed è cruciale meccanismi di ricompensa. [Wise, 2004]

Peculiarità del sistema dopaminergico mesocorticale è quella di influenzare le interazioni con la corteccia prefrontale e l'area visiva, esso è infatti coinvolto nello sviluppo della memoria visiva. [William e Goldman-Rakic, 1995]

Disturbi al sistema dopaminergico mesocorticolimbico sono associati a schizofrenia, stati allucinatori, sindromi depressive, dipendenza da droghe d'abuso e al ADHA (sindrome da deficit di attenzione ed iperattività). [Castellanos e Tannock, 2002]

E' stato osservato che nello sviluppo cerebrale la dopamina regola la neurogenesi [Pendleton et al, 1998], mentre la distruzione del sistema dopaminergico in fase di sviluppo embrionale danneggia la maturazione ed il corretto modellamento SNC. [Lauder, 1988 e 1993]

Inoltre è emerso che è necessario un perfetto bilanciamento nei livelli di dopamina per la corretta funzionalità cognitiva, poichè sia un suo eccessivo aumento che diminuzione nella corteccia prefrontale, provoca dei problemi ad eseguire compiti working memory-dipendenti. [Abi-Dargham et al, 2002]

**1.2.3.3 IL SISTEMA NORADRENERGICO DEL LOCUS COERULEUS (LC)****ANATOMIA:**

I neuroni noradrenergici all'interno del sistema nervoso centrale (SNC) sono compresi essenzialmente in due strutture:

- il *tegmento laterale* (LT)
- il *Locus Coeruleus* (LC).

E vengono classificati topograficamente in sei gruppi (A1, A2, A4-A7). [Dahlstrom e Fuxe, 1964]

Il *tegmento laterale* viene suddiviso ulteriormente in due parti:

- il *tegmento laterale medullare*, è compreso nella *formazione reticolare laterale e ventrale* del *bulbo caudale* (A1), nel *tratto solitario* e nel *nucleo motorio dorsale* del *nervo vago* (A2).
- il *tegmento laterale pontino*, è collocato nel *ponte* e comprende i gruppi A5 ed A7. In particolare il gruppo A7 costituisce la parte più rostrale del sistema noradrenergico e si situa medialmente ed all'interno del *nucleo del lemnisco*

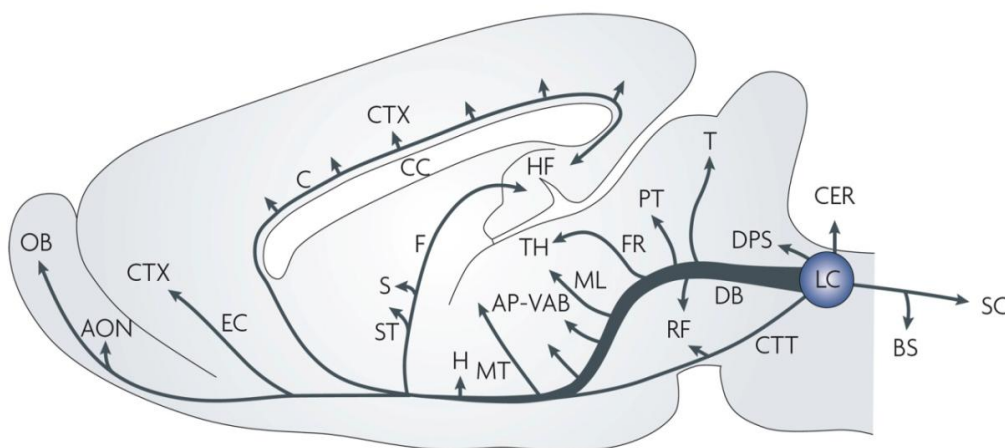


*laterale*; mentre il gruppo A5 è posto più ventralmente e contribuisce a formare l'area del *SubCoeruleus* (SubC).

Le cellule noradrenergiche appartenenti a questa struttura proiettano principalmente verso il *midollo spinale*, il *bulbo* e l'*ipotalamo*.

Il *Locus Coeruleus* invece è responsabile dell'innervazione noradrenergica del SNC, ed è composto da un gruppo compatto di cellule posizionato nella sostanza grigia laterale dell'istmo del *ponte* (gruppo A6), e da altri neuroni che si estendono lungo il tegmento dorso-laterale fino ad arrivare al tetto del quarto ventricolo (A4). Inoltre, la parte più ventrale della popolazione cellulare A6, assieme al gruppo A5, costituisce l'area del SubC.

Pur essendo composto da un numero relativamente basso di cellule (da 45000 a 60000 nell'uomo [German et al, 1988; Baker et al, 1989] e circa 1500 per nucleo nel ratto [Berridge e Waterhouse, 2003]) il LC innerva la maggior parte delle strutture del SNC. [Jones et al, 1977]



**Fig. 1.11:** Rappresentazione schematica dell'innervazione noradrenergica che origina dal *Locus Coeruleus* nel ratto. [Sara, 2009]

In particolare, le fibre discendenti provenienti dal LC vanno ad innervare, nella quasi totalità, il *midollo spinale* (SC); fornendo l'innervazione noradrenergica alle *corna dorsali e ventrali*, ed anche ai neuroni spinali della *colonna cellulare inter-medio-laterale*. [Nygren e Olson, 1977; Westlund et al, 1982 e 1983] Inoltre, vanno ad innervare diverse aree del *bulbo*, fra cui i *nuclei parasimpatici di Edinger-Westphal*, il *nucleo salivatorio* ed il *nucleo vagale parasimpatico*, i *nuclei premotori simpatici (bulbo rostro-ventro-laterale e rafe caudale)*, il *rafe dorsale*, il *tegmento latero-dorsale e peduncolopontino*, ed i *nuclei motori (facciale, ippoglosso, trigemino ed oculomotore)* e *sensoriali (trigemino e cocleare)*. [Samuels e Szabadi, 2008]

Il LC innerva anche il *cervelletto* (in particolare la *corteccia cerebellare*). [Saigal et al, 1980]

L'encefalo presenta una diffusa innervazione noradrenergica proveniente quasi esclusivamente dal LC. Numerose fibre noradrenergiche sono presenti nel *talamo*, specialmente quello dorsale, nell'*ipotalamo*, nel *prosencefalo di base*, nell'*amigdala* ed in altre

zone del diencefalo. [Samuels e Szabadi, 2008] Ma le aree encefaliche dove le fibre noradrenergiche provenienti dal LC sono più dense sono: la *neocorteccia* (in particolare la *corteccia frontale e cingolata*) e l'*ippocampo*. [Levitt e Moore, 1979] Il LC, grazie al suo arrangiamento ed all'alto numero di proiezioni assonali, riesce ad innervare la quasi totalità del SNC e a regolare simultaneamente molteplici zone anche distanti tra loro. [Loughlin et al, 1982] (Fig. 1.11)

Il LC a sua volta riceve input da numerose strutture del SNC, quali: la *neocorteccia*, l'*amigdala*, l'*ipotalamo*, il *tegmento laterale*, il *nucleo del rafe*, il *bulbo*, il *cervelletto* ed il *midollo spinale*. [Samuels e Szabadi, 2008]

#### SVILUPPO:

I neuroni noradrenergici hanno un'origine embriologica piuttosto precoce. Nel ratto, si è osservato che essi si originano fra E10 ed E13. A partire da E14, tali cellule iniziano ad esprimere gli enzimi biosintetici monaminegici, in particolare la tirosina idrossilasi (TH), e a produrre noradrenalina. [Lauder e Bloom, 1974].

Le fibre noradrenergiche ascendenti raggiungono la corteccia fra E16 ed E18 [Coyle e Molliver, 1977] ed una settimana prima della nascita, anche tutte le altre aree d'innervazione, con la comparsa di numerose varicosità. L'innervazione noradrenergica delle regioni target viene però completata solamente a partire dalla terza settimana di vita. In questo periodo le concentrazioni di noradrenalina raggiungono i valori che avranno anche nell'adulto nel bulbo e nel cervelletto [Rho e Storey, 2001], mentre nelle aree superiori tali livelli vengono raggiunti solamente fra P30 e P40. [Loizou e Salt, 1970]

I neuroni dei primati non umani iniziano a produrre noradrenalina fra la quinta e la sesta settimana di gestazione, mentre l'innervazione noradrenergica che raggiunge la corteccia si sviluppa a partire dall'ottava settimana e si completa verso il secondo anno di vita. Esistono molte evidenze di una diversa funzionalità noradrenergica nel SNC in via di sviluppo rispetto a quello adulto. In particolare si è visto che il sistema noradrenergico nel neonato presenta una differente espressione recettoriale (alfa-2) nell'ippocampo e che gli effetti della stimolazione di questi risultano essere opposti in periodi diversi dello sviluppo. [Murrin et al, 2007]

#### FUNZIONI:

L'innervazione noradrenergica è molto diffusa all'interno del SNC, ma gli effetti che provoca variano in base alle zone che raggiunge. Questi sono dovuti essenzialmente alla presenza di diversi tipi di recettori noradrenergici: gli alfa-1 mediano gli effetti eccitatori post-sinaptici, gli alfa-2 sono inibitori ed i recettori beta sono classificati come eccitatori. [Berridge e Waterhouse, 2003] Tutti questi recettori sono accoppiati a proteine G, quindi

agiscono in modo relativamente lento, e sono coinvolti prevalentemente nella regolazione tonica dell'eccitabilità cellulare (rallentando o facilitando la trasmissione del segnale), piuttosto che nella trasmissione fasica. Inoltre è da notare che, solo un quinto della noradrenalina prodotta dalle cellule del LC viene rilasciata in sinapsi vere e proprie, mentre la maggior parte viene rilasciata in corrispondenza delle varicosità degli assoni e dei dendriti [Seguela et al, 1990], quindi agendo su siti extrasinaptici, con una modalità denominata trasmissione di volume. [Marien et al, 2004] Questa modalità di trasmissione, tipica dei neuroni neuromodulatori, permette un'influenza più prolungata sulla plasticità sinaptica. [Sara, 2009]

E' stato visto che la noradrenalina ha un ruolo permissivo nella formazione della LTP nell'*ippocampo* e che modula anche la LTD. [Kemp e Manahan-Vaughan, 2008]

Il sistema noradrenergico oltre ad essere coinvolto nella regolazione dell'eccitabilità cellulare e nei fenomeni di plasticità sinaptica, svolge altre molteplici funzioni. E' implicato ad esempio in vari processi cognitivi, quali il consolidamento ed il recupero (*retrieval*) delle tracce mnemoniche, nell'attenzione e nella percezione; come hanno mostrato diversi studi farmacologici. [Sara, 1985 e 1998; Devauges e Sara, 1991; Tronel et al, 2004]

Inoltre, si è visto che il sistema noradrenergico svolge un ruolo fondamentale nella formazione del SNC, in particolare della corteccia cerebrale, e di conseguenza è importante per il corretto funzionamento dei processi di apprendimento e memoria che sottendono a questa regione anatomica. [Lauder e Bloom, 1974; Sanders et al, 2008] Il suo ruolo determinante nella regolazione dell'apprendimento e della memoria è dimostrato anche dalla ricca innervazione noradrenergica che raggiunge l'*ippocampo*, sede notoriamente implicata in tali processi [Amaral e Foss, 1975; Becker et al, 1980; Everitt et al, 1983; Compton, 1991], e dai disturbi cognitivi che conseguono alla deafferentazione noradrenergica di codesta struttura anatomica. [Marien et al, 2004]

Inoltre, il sistema noradrenergico, tramite le sue proiezioni discendenti, che originano dai neuroni più ventrali del LC e da quelli dell'area del SubC, modula alcuni aspetti dell'attività spinale quali l'attività motoria riflessa ed organizzata in pattern [Marcoux e Rossignol, 2000], la trasmissione degli stimoli nocicettivi [Jones e Gebhart, 1986] e l'aumento dell'eccitabilità motoneuronale. [Hultborn e Kiehn, 1992]

Il LC coordina la velocità e l'efficacia degli stimoli superiori ed, agendo simultaneamente sugli input sensoriali e gli output motori, gestisce sia la ricezione che la risposta agli stimoli ambientali importanti per la sopravvivenza dell'organismo [Berridge e Waterhouse, 2003].

Inoltre, il LC tramite le proiezioni che invia alla *colonna cellulare mediolaterale*, eccita i neuroni pregangliari simpatici [Lewis e Coote, 1990] ed inibisce i neuroni sacrali parasimpatici. [Yoshimura et al, 1990]

Il sistema noradrenergico ha poi un ruolo fondamentale nel controllo della vigilanza e del ciclo sonno-veglia [Hobson et al, 1975] e regola le funzioni cardiovascolari e respiratorie. [Sara, 2009] L'innervazione noradrenergica infine, sembra giocare un ruolo importante anche nei fenomeni infiammatori nel SNC. [Carnevale et al, 2007] È stato infatti osservato come la noradrenalina sia in grado di bloccare l'espressione del *complesso maggiore di istocompatibilità II*, del fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-alfa), dell'interleuchina 1-beta (IL1-beta) e dell'isoforma inducibile dell'ossido nitrico sintasi (iNOS). [Feinstein, 1998] La noradrenalina sarebbe inoltre in grado di inibire l'attivazione degli astrociti e della microglia indotta a seguito di fenomeni infiammatori e di stimolare la fagocitosi da parte dei macrofagi. [Feinstein et al, 2002; Heneka et al, 2003]

Alterazioni nell'attività dei neuroni noradrenergici del LC sembrano essere implicate in vari disturbi del comportamento tra cui diverse forme di ansia [Samuels e Szabadi, 2008], nelle malattie da stress [Dunn e Swiergiel, 2008], in particolare nel disordine da stress post-traumatico [Krystal e Neumeister, 2009], e nella depressione. [Zubenko et al, 1990; Thor et al, 2007] La noradrenalina sembra inoltre avere un ruolo nella suscettibilità agli attacchi epilettici. [Weinshenker e Szot, 2002]

Inoltre esistono evidenze circa un coinvolgimento noradrenergico in alcune patologie neurodegenerative. Per esempio, per quanto riguarda il morbo di Parkinson, diversi studi anatomici, elettrofisiologici, neurochimici e comportamentali indicano che la noradrenalina è importante nel funzionamento della via nigro-striatale; vi è infatti una marcata riduzione dei neuroni noradrenergici nel LC di pazienti affetti da tale patologia. [Zarow et al, 2003] Numerosi dati sperimentali fanno anche supporre un coinvolgimento primario del sistema noradrenergico nella patologia di Alzheimer (AD). [Marien et al, 2004]

## 2. Scopi della tesi

Tramite il lavoro presentato in questa tesi si sono voluti andare ad indagare alcuni aspetti anatomici, neurochimici e funzionali che sono coinvolti nello sviluppo dei disturbi cognitivi e della demenza associati alle malattie di Alzheimer e di Parkinson.

Da studi presenti in letteratura si è visto che in entrambe queste patologie è presente una massiva neurodegenerazione dei sistemi di neuromodulazione, quali il colinergico, il dopaminergico ed il noradrenergico; e che quest'ultimo in particolare, in rapporto agli altri, è caratterizzato da una percentuale più elevata di perdita neuronale che avviene nelle prime fasi del processo patologico che caratterizza queste malattie. [Zarow et al, 2003]

Partendo da questi presupposti, si è andati a distruggere selettivamente (in maniera singola o combinata) questi sistemi nel ratto, per:

- vedere se la loro lesione è sufficiente ad indurre deficit nella *reference* e nella *working memory*,
- capire il contributo che forniscono ai processi di apprendimento e memoria spaziale,
- osservare come la loro interazione influenzi la comparsa o meno di tali disturbi cognitivi.

Altra peculiarità delle malattie neurodegenerative, che si affianca alla deplezione neurotrasmettitoriale, è la presenza di aberranti aggregazioni proteiche in *ippocampo* e *corteccia*. Notoriamente le placche extracellulari di beta-amiloide ed i grovigli neurofibrillari intracellulari che includono la proteina tau-iperfosforilata caratterizzano la malattia di Alzheimer. Recentemente però si è visto che anche la proteina TDP-43 risulta essere alterata in questa patologia, in particolare si presenta ubiquinata, fosforilata e tende ad accumularsi nel citoplasma dei neuroni. [Hu et al, 2008; Lippa et al, 2009] Da studi che si propongono di indagare le possibili associazioni che intercorrono tra i diversi elementi patologici dell'AD è stato visto che l'RNA del gene MAPT (che codifica per la proteina tau) è regolato dalla proteina TDP-43, e quindi si è ipotizzato che la perdita di funzione di quest'ultima potrebbe avere conseguenze sulla fosforilazione di tau [Tremblay et al, 2011]; inoltre in topi transgenici (3xTg-AD), che sviluppano declino cognitivo con l'avanzare dell'età ed accumulo di beta-amiloide e tau, si è visto che i livelli di TDP-43 sono correlati significativamente alla presenza degli oligomeri di beta-amiloide. [Caccamo et al, 2010] Nessuno studio fin'ora ha però indagato se esiste una relazione tra l'ipofunzione colinergica e l'accumulo di TDP-43.

Per questo motivo, riproducendo un modello di AD ben caratterizzato nel nostro laboratorio, che consiste nella deplezione del sistema colinergico del *prosencefalo di base* tramite l'inoculo dell'immunotossina 192-IgG-saporina e l'infusione in *ippocampo* di beta-amiloide 25-35 pre-aggregata, si è andati ad indagare nel ratto se:

- le conseguenze anatomiche e funzionali di queste lesioni rispecchiano quelle trovate in pazienti di AD;
- ci sono delle alterazioni nell'espressione regionale di APP, TAU, TAU-P e TDP-43 che possono essere associate alle lesioni; e se presenti come variano i livelli di queste proteine tra gli animali che presentano la sola deplezione del sistema colinergico, quelli con la sola infusione del peptide beta-amiloide pre-aggregato e quelli che hanno ricevuto entrambi i trattamenti.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 ANIMALI E CONDIZIONI DI ALLEVAMENTO

Gli esperimenti effettuati per questa tesi includono l'uso di animali da laboratorio. Tutte le procedure adottate per testarli e stabularli sono conformi alla normativa in materia di sperimentazione animale in vigore in Italia (D.L. 116/92 e 96/2013, art. 13), in accordo alle direttive del Concilio della Comunità Europea (2010/63/EU) ed hanno avuto l'approvazione del Comitato Etico dell'Università degli Studi di Trieste.

Sono stati usati ratti neonati ed adulti di ceppo Sprague-Dawley (SD), forniti dallo Stabulario dell'Università degli Studi di Trieste e mantenuti presso la medesima struttura per tutta la durata degli esperimenti. Le cucciolate sono state mantenute con la madre fino al ventunesimo giorno di vita (una cucciolata per gabbia) e dopo lo svezzamento gli animali sono stati divisi per sesso e stabulati a gruppi di 2-4 individui in gabbie di Plexiglass trasparente in condizioni controllate, con un ciclo di luce/buio di 12 ore ed avendo a disposizione cibo e acqua *ad libitum*.



**Fig. 3.1:** Esempio di ratto Sprague-Dawley adulto.

### 3.2 DESING SPERIMENTALE

Questo lavoro di tesi ha previsto l'indagine di due differenti aspetti comuni alle malattie neurodegenerative:

- 1) la disfunzione della regolazione monoaminergica e la sua influenza nella comparsa di deficit di apprendimento e memoria spaziale;
- 2) gli effetti anatomici, neurochimici e funzionali risultanti dalla deplezione colinergica in associazione all'infusione ippocampale di beta-amiloide 25-35 pre-aggregata.

In particolare, tramite il primo set di esperimenti sono stati caratterizzati i deficit cognitivi che compaiono nel ratto dopo lesione selettiva e combinata dei sistemi di neuromodulazione, quali: il sistema colinergico del prosencefalo di base, il sistema dopaminergico mesocorticolimbico che si origina dalla VTA ed il sistema noradrenergico ascendente che deriva dal *Locus Coeruleus*. Oltre all'aspetto funzionale conseguente a queste

disfunzioni è stato analizzato anche quello istologico tramite opportune procedure istochimiche ed immunochimiche.

Il secondo set di esperimenti invece è servito ad indagare se c'è una relazione tra la deplezione colinergica, il deposito di aggregati di beta-amiloide nell'ippocampo, la comparsa di deficit cognitivi e l'alterazione tissutale della proteina TDP-43 e delle altre proteine che nell'AD sono notoriamente sovraesprese, quali: APP, TAU e TAU-P. A tal fine sono stati usati test comportamentali per l'analisi della funzionalità della *reference* e della *working memory*, procedure istochimiche ed immunochimiche *ad hoc* per la rilevazione della morfologia e delle caratteristiche neuropatologiche presenti in questi tessuti ed analisi tramite *Western Blot* dei livelli delle proteine indagate.

### **3.2.1 Disfunzione della regolazione monoaminergica nel ratto**

Per questo primo set di esperimenti sono stati utilizzati un totale di 80 ratti Sprague-Dawley, che in base alla combinazione delle lesioni ricevute sono stati divisi nei seguenti gruppi:

- CONTROLLI (CTRL): questo gruppo è costituito da 4 animali intatti (non trattati), da 3 animali trattati con veicolo (PBS1X sterile), iniettato bilateralmente nei *ventricoli laterali* durante il quarto giorno post-natale (P4) e da 3 animali infusi da adulti in VTA con il secondo tipo di veicolo (acido ascorbico 0,05%).
- SINGOLI LESIONATI DA (DA les): questo gruppo è costituito da 10 animali a cui da adulti (a due mesi di vita) è stata iniettata stereotassicamente la neurotossina 6-idrossidopamina (6-OHDA) nell'*area tegmentale ventrale* (VTA), in modo da andare a colpire i neuroni dopaminergici presenti in questa regione.
- SINGOLI LESIONATI ACh (ACh les): questo gruppo è costituito da 10 animali a cui a P4 è stata iniettata bilateralmente nei *ventricoli laterali*, l'immunotossina 192-IgG-saporina (192-IgG-sap), che ha come bersaglio i neuroni colinergici del *prosencefalo di base* (BF).
- SINGOLI LESIONATI NA (NA les) : questo gruppo è costituito da 10 animali a cui a P4 è stata iniettata bilateralmente nei *ventricoli laterali*, l'immunotossina anti-DBH-saporina (anti-DBH-sap), selettiva per i neuroni noradrenergici del *Locus Coeruleus* (LC).
- DOPPI LESIONATI ACh-NA (ACh-NA les): questo gruppo è costituito da 10 animali a cui a P4 è stata iniettata bilateralmente nei *ventricoli laterali*, sia l'immunotossina 192-IgG-sap che l'anti-DBH-sap, andando a ledere sia il sistema colinergico del BF che il sistema noradrenergico ascendente proveniente dal LC.



- DOPPI LESIONATI ACh-DA (ACh-DA les): questo gruppo è costituito da 10 animali a cui è stata iniettata l'immunotossina 192-IgG-sap nei *ventricoli laterali* a P4, e la neurotossina 6-OHDA nella VTA da adulti; causando rispettivamente la deplezione di neuroni colinergici del BF e di quelli dopaminergici che forniscono l'innervazione al sistema mesocorticolimbico.
- DOPPI LESIONATI NA-DA(NA-DA les): questo gruppo è costituito da 10 animali a cui è stata iniettata l'immunotossina anti-DBH-sap nei *ventricoli laterali* a P4, e la neurotossina 6-OHDA nella VTA da adulti; provocando rispettivamente la deplezione di neuroni noradrenergici e di quelli dopaminergici siti in quella regione.
- TRIPLI LESIONATI (TRIPLE les): in questo gruppo sono compresi 10 animali che hanno ricevuto l'infusione delle due immunotossine (192-IgG-sap e anti-DBH-sap) a P4 nei *ventricoli laterali*, e della neurotossina 6-OHDA nella VTA da adulti. Questi quindi presentano la deplezione a tutti e tre i sistemi neurotrasmettitoriali presi in esame.

A tre mesi di vita gli animali così trattati sono stati sottoposti ad una batteria di test comportamentali per valutare le loro abilità cognitive, in particolare si è analizzata la loro memoria di riferimento spaziale e quella di lavoro, utilizzando rispettivamente il *Morris Water Maze* (MWM) ed il *Radial Arm Water Maze* (RAWM). Alla fine della sessione sperimentale (durata all'incirca tre settimane), gli animali sono stati sacrificati ed il cervello è stato rimosso rapidamente, dissezionando da un emisfero la corteccia prefrontale, quella fronto-parietale e l'ippocampo, conservandoli a -80°C in previsione di analisi future con HPLC (High Performance Liquid Chromatography) o Western Blot; il resto del tessuto cerebrale invece è stato fissato in una soluzione di paraformaldeide 4% (PFA) per essere successivamente tagliato al microtomo ed analizzato tramite analisi istochimiche ed immunochimiche.

### ***3.2.2 Effetti neuropatologici indotti da deplezione colinergica ed infusione ippocampale di beta-amiloide pre-aggregata nel ratto***

Per questo secondo set di esperimenti sono stati utilizzati un totale di 32 ratti di ceppo Sprague-Dawley. In base al trattamento ricevuto, questi animali sono stati divisi in quattro gruppi così definiti:

- CONTROLLI (CTRL): questo gruppo è costituito da 4 animali intatti (non trattati) e da 4 animali trattati con veicolo (PBS1X sterile), iniettato bilateralmente in *ippocampo*, nel *nucleo basale magnocellulare* (NBM), nel *setto mediale* (MS) e nella *banda diagonale di Broca* (DBB).

- SINGOLI LESIONATI (SINGLE les): questo gruppo è costituito da 8 animali a cui è stata iniettata stereotassicamente l'immunotossina 192-IgG-saporina, selettiva per i neuroni colinergici, nel NBM, nel MS e nella DBB.
- SINGOLI AMILOIDE (SINGLE amy): questo gruppo è costituito da 8 animali a cui è stata iniettata bilateralmente in *ippocampo* la beta-amiloide 25-35 pre-aggregata.
- DOPPI LESIONATI (DOUBLE): questo gruppo è costituito da 8 animali che hanno ricevuto sia l'iniezione dell'immunotossina 192-IgG-sap in NBM, MS e DBB, che l'infusione ippocampale di beta-amiloide 25-35 pre-aggregata.

Al momento delle procedure chirurgiche tutti gli animali pesavano all'incirca 250 g e dopo un mese gli animali sono stati sottoposti ad una batteria di test comportamentali per verificare le loro capacità di apprendimento e memoria spaziale. Sono stati usati in particolare il MWM ed il RAWM, adatti rispettivamente a rilevare deficit nella *reference* e nella *working memory*. Gli animali sono stati quindi sacrificati a circa 2 mesi di distanza dalle procedure chirurgiche, e durante le procedure di rimozione del cervello, da un emisfero è stato dissezionato l'ippocampo e mantenuto a -80°C per analizzare il suo contenuto proteico tramite analisi con Western Blot. Il resto tessuto cerebrale è stato fissato in PFA al 4%, tagliato al microtomo ed analizzato tramite procedure di istochimica ed immunochimica.

### **3.3 SOSTANZE**

#### **3.3.1 Immunotossine**

Il meccanismo di azione delle immunotossine che sono state utilizzate in questo lavoro di tesi è descritto nella sezione "modelli lesivi" nel capitolo 1.1.2.2 dell'introduzione. (Fig. 1.6)

##### **3.3.1.1 192-IgG-saporina**

Questa immunotossina si lega ai recettori p75NTR a bassa affinità per l'NGF, che sono espressi selettivamente dai neuroni colinergici del *prosencefalo di base*, e dei quali provoca la morte cellulare tramite blocco dell'attività ribosomiale. Viene quindi usata per ottenere la deplezione del sistema colinergico ascendente.

La 192-IgG-saporina (Advanced Targeting Systems, CA, USA) viene disciolta in PBS1X sterile e conservata a -80°C.

Per le operazioni neonatali con iniezione nei *ventricoli laterali* viene utilizzata ad una concentrazione finale di 0,02 ug/uL; mentre per l'infusione locale nel parenchima dell'adulto la concentrazione finale è di 0,13 ug/uL.

### **3.3.1.2 anti-DBH-saporina**

Questa immunotossina riconosce l'enzima dopamina-beta-idrossilasi (DBH) che viene espresso sulla membrana dei neuroni noradrenergici al momento del rilascio della noradrenalina e tramite internalizzazione della saporina provoca la morte cellulare di questi. Viene usata quindi per provocare la deplezione selettiva dei neuroni noradrenergici appartenenti al *Locus Coeruleus* e perciò di tutta l'innervazione noradrenergica ascendente. L'anti-DBH-sap (Advanced Targeting Systems, CA, USA) viene disciolta in PBS1X sterile e conservata a -80°C fino al momento del suo utilizzo.

Nelle operazioni neonatali effettuate per questa tesi è stata utilizzata ad una concentrazione finale di 0,02 ug/uL.

## **3.3.2 Neurotossine**

### **3.3.2.1 6-idrossidopamina**

Per la descrizione del meccanismo d'azione della 6-idrossidopamina (6-OHDA) si rimanda alla sezione "modelli lesivi" del capitolo 1.1.3.2 dell'introduzione di questa tesi. (Fig. 1.7)

La 6-OHDA iniettata in VTA va a distruggere selettivamente i neuroni dopaminergici contenuti in quell'area, e di conseguenza anche l'innervazione che da lì diparte per raggiungere le strutture limbiche e la corteccia.

La 6-OHDA (Sigma) viene conservata a -20°C e poco prima dell'uso disciolta in acido ascorbico allo 0,05%. La concentrazione finale utilizzata per le iniezioni intracerebrali in ratti adulti corrisponde a 4,5 ug/uL.

### **3.3.3 Beta-amiloide 25-35 pre-aggregata**

Per questa tesi è stato utilizzato il frammento 25-35 del peptide di beta amiloide (Bachem). Si rimanda alla sezione "beta-amiloide" capitolo 1.1.1.2 dell'introduzione per un approfondimento sulla sua funzione.

Viene conservato a -20°C e quattro giorni prima del suo utilizzo viene disciolto in PBS1X sterile ad una concentrazione di 5 ug/uL ed incubato a 37°C per permetterne l'aggregazione in oligomeri e proto-fibrille. (Fig. 1.3)

### **3.3.4 Altre sostanze utilizzate**

- Cloralio idrato (Fluka) al 5%, iniettato i.p. ad una dose di 7mL/Kg; usato come anestetico.
- Tramadolo 10% (fornito dal veterinario dello stabulario) iniettato sottocute (1mL/Kg); usato come antidolorifico durante il periodo post-operatorio.

- Paraformaldeide (Sigma) al 4% disciolta in buffer fosfato (PB); usata per fissare i cervelli.
- Saccarosio al 20% disciolto in PB; usato come crioprotettore dopo la fissazione dei cervelli.
- Antifreeze (soluzione homemade costituita da: glicerolo (Merck) ed etilen glicolo (Fluka) disciolti in PB). E' usato per criopreservare le sezioni tagliate al microtomo e permettere la loro conservazione a -20°C.
- AB Complex Kit (Vector); usato in immunistoichimica per l'amplificazione del segnale tramite sistema avidina-biotina.
- 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma); è la perossidasi del rafano ed è usata in immunistoichimica per la rilevazione colorimetrica del segnale.
- DPX (Distrene, Plasticiser, Xylene) mounting medium (Sigma); resina sintetica utilizzata come montante per i vetrini.
- Cresil violetto acetato (Acros); usato per la colorazione di Nissl.
- Solfuro d'ammonio al 4% e nitrato d'argento (Acros) allo 0,1%; usati per la rilevazione colorimetrica delle fibre AChE positive.

### **3.4 PROCEDURE *IN VIVO***

#### **3.4.1 Procedure di microchirurgia**

##### **3.4.1.1 LESIONI NEONATALI**

Le lesioni neonatali sono state effettuate il quarto giorno dopo la nascita (P4) in ratti anestetizzati mediante ipotermia. Entrambe le immunotossine (192-IgG-sap e anti-DBH-sap) o il veicolo (PBS1X sterile) sono stati iniettati con una siringa Hamilton (SGE) da 10 uL bilateralmente nei *ventricoli laterali* (Fig. 3.2) alle seguenti coordinate:

Antero-posteriore (AP): -0,8 mm

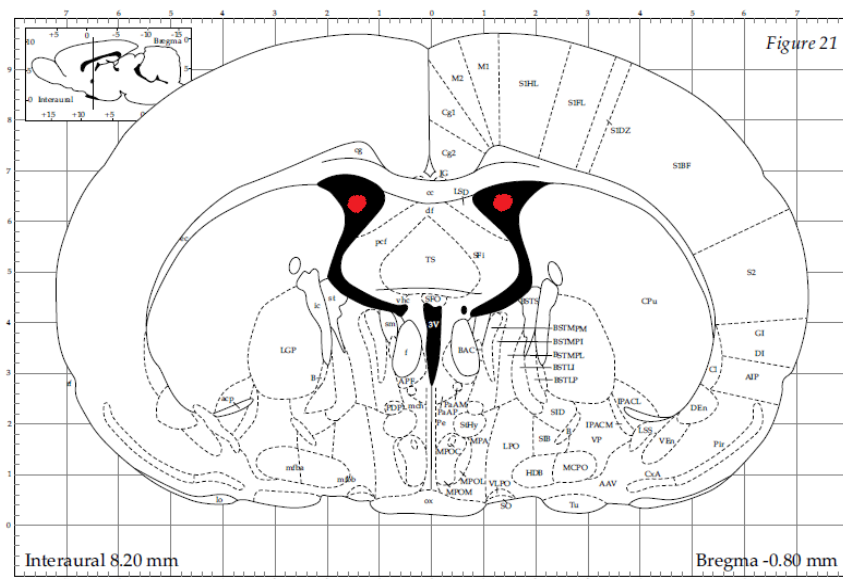
Laterale (L):  $\pm 0,8$  mm

Verticale (V): 2,2 mm

Come punti di riferimento sono stati presi il Bregma e la superficie cutanea craniale. [Leanza et al, 1996]

Per animale è stato iniettato un volume pari a 5+5 uL contenente 2 ug per immunotossina.

Dopo le procedure chirurgiche gli animali sono stati riportati alla loro normale temperatura corporea riscaldandoli con una copertina termica, ed in seguito sono stati restituiti alla madre.



**Fig. 3.2:** I puntini rossi in figura mostrano i siti d'iniezione delle immunotossine 192-IgG-sap ed anti-DBH-sap o del veicolo (PBS1X sterile), e corrispondono ai ventricoli laterali.  
[Modificata da Paxinos e Watson, 1998]

### 3.4.1.2 LESIONI IN ADULTO

Tutte le operazioni chirurgiche in animale adulto sono state effettuate a partire dalla sesta settimana di vita, previa anestesia profonda effettuata i.p. con Cloralio Idrato al 5% (dose: 7 mL/Kg).

Gli animali sono stati fissati su un apparato stereotassico (Kopf), la superficie da incidere è stata disinfettata, il cranio è stato esposto e con un trapano sono stati fatti dei buchi alle coordinate d'interesse per permettere l'iniezione delle sostanze tramite siringhe Hamilton (SGE) da 10 uL. Le siringhe sono state introdotte con attenzione nel parenchima cerebrale, ed una volta raggiunto il sito d'iniezione si è atteso un minuto prima di iniettare, in modo da permettere al tessuto di ricompattarsi ed evitare così il reflusso della sostanza. Dopo l'iniezione, effettuata molto lentamente (ad una velocità pari a circa 0,5 uL/min), si è atteso due minuti ed in seguito la siringa è stata rimossa. Le coordinate AP ed L sono state calcolate prendendo il Bregma come punto di riferimento (pari a 0), mentre quelle V sono state calcolate a partire dalla dura basandosi sull'atlante stereotassico di Paxinos e Watson, 1998. Finite le operazioni chirurgiche gli animali hanno ricevuto dei punti di sutura nella zona della cute che è stata incisa, sono stati disinfettati con Betadine e posizionati sotto una lampada riscaldante in modo da ripristinare la loro normale temperatura corporea. Durante il periodo post-operatorio, per due giorni, gli è stato somministrato sottocute un antidolorifico (Tramadol 10%; ad una dose di 1 mL/Kg) fornito dal veterinario della struttura.

Le operazioni riguardanti il primo set di esperimenti (*disfunzione della regolazione monoaminergica nel ratto*) hanno previsto l'iniezione della neurotossina 6-OHDA nella *zona tegmentale ventrale* (VTA) (Fig. 3.3) alle seguenti coordinate:

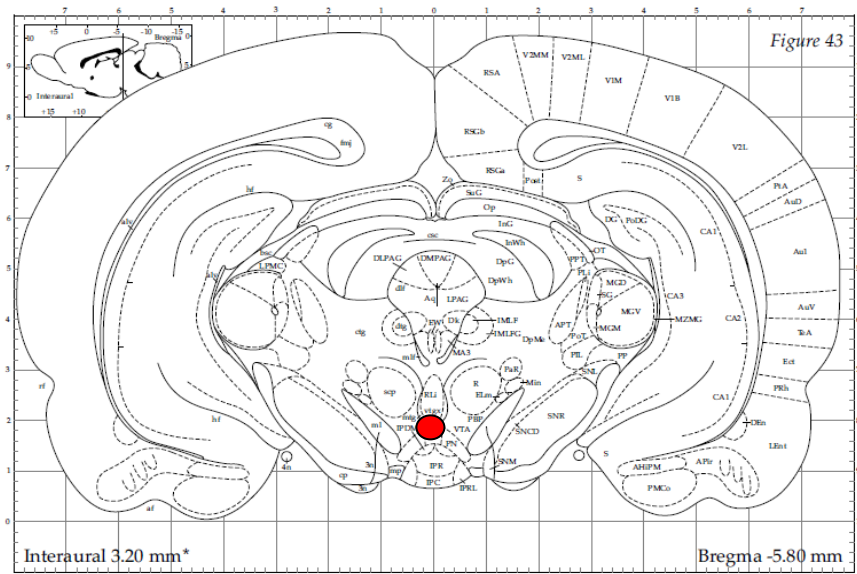
AP: -5,4 mm

L: -1,5 mm

V: -7,2 mm

Il tooth-bar (tb) è stato posizionato a -2,3 mm e si è iniettato con un angolo d'incidenza pari a +13°.

Per animale sono stati iniettati 2 uL di sostanza contenenti 9 ug di tossina disciolti in acido ascorbico allo 0.05%.



**Fig. 3.3:** Il punto rosso in figura mostra il sito d'iniezione della 6-OHDA, che corrisponde alla VTA. [Modificata da Paxinos e Watson, 1998]

Invece, per quanto riguarda il secondo set di esperimenti (*effetti neuropatologici indotti da deplezione colinergica ed infusione ippocampale di beta-amiloide pre-aggregata nel ratto*) l'immunotossina colinergica 192-IgG-sap è stata iniettata in MS, NBM e DBB, mentre il peptide di beta-amiloide 25-35 pre-aggregato in *ippocampo*. Negli animali di controllo il veicolo (PBS1X) è stato iniettato in tutti e quattro questi siti.

La 192-IgG-sap è stata somministrata ad una concentrazione di 1,3 ug/uL. Le coordinate utilizzate per i diversi siti d'iniezione sono le seguenti:

per raggiungere la DBB ed il MS (Fig. 3.4):

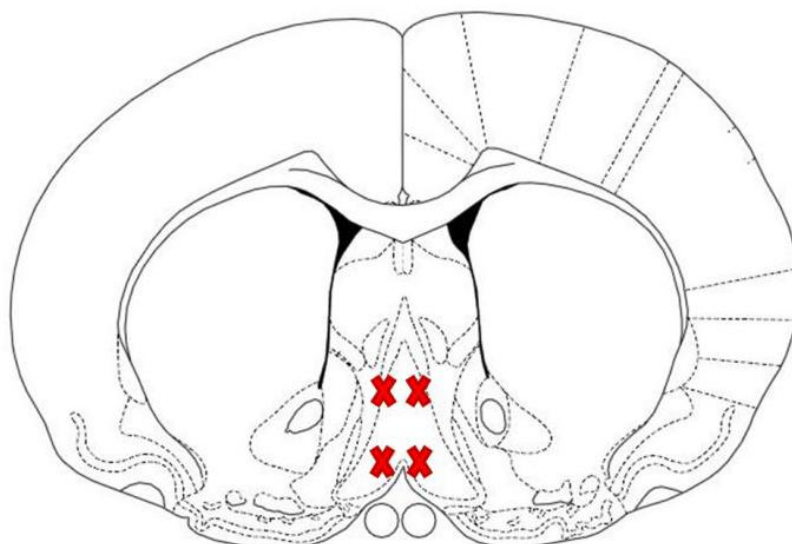
AP: +0,5 mm

L: ±0,6 mm

V: -7,7 mm e poi si è risaliti a -6,1 mm

tb: -3,3 mm

E per lato sono stati iniettati 0,3 uL nel primo sito (DBB) e 0,2 uL nel secondo (MS) di sostanza ad animale.



**Fig. 3.4:** In rosso sono mostrati i siti di iniezione dell'immunotossina colinergica 192-IgG-sap o del veicolo (PBS1X sterile). Quelli più in alto indicano il MS, mentre quelli più in basso la zona della DBB. [Modificata da Paxinos e Watson, 1998]

per raggiungere il NBM (Fig. 3.5):

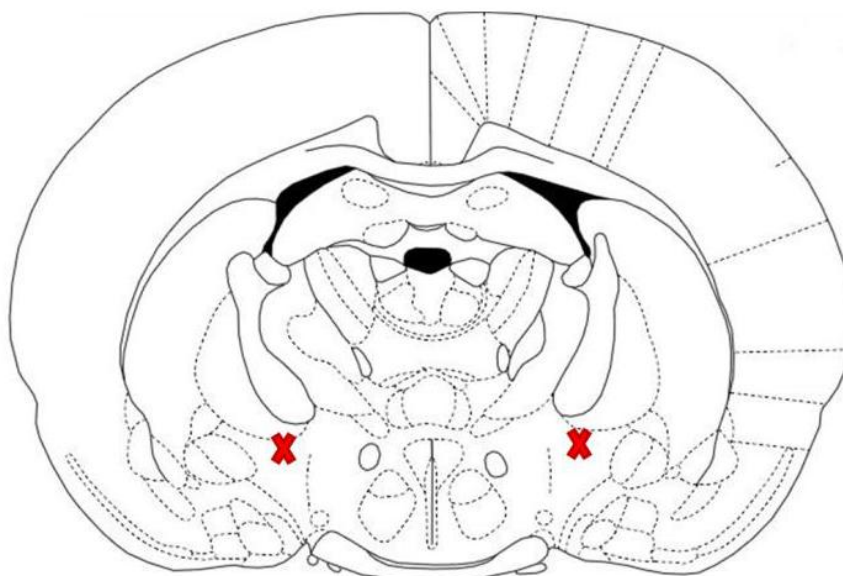
AP: +1 mm

L:  $\pm 3,3$  mm

V: -7,5 mm

tb: +5 mm

Per lato sono stati iniettati 0,7 uL di sostanza ad animale.



**Fig. 3.5:** In rosso sono mostrati i siti di iniezione dell'immunotossina colinergica 192-IgG-sap o del veicolo (PBS1X sterile) corrispondenti al NBM. [Modificata da Paxinos e Watson, 1998]

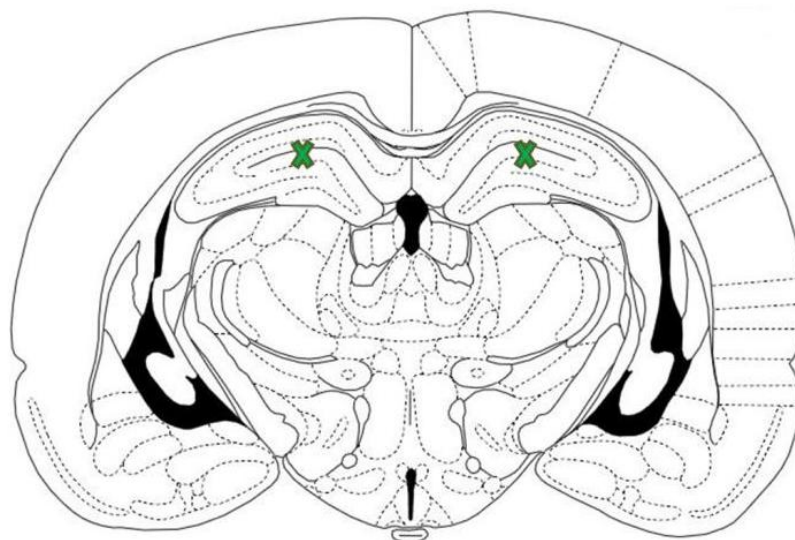
La beta-amiloide 25-35 pre-aggregata è stata invece iniettata ad una concentrazione pari a 5 ug/uL, inoculando 1 uL di sostanza per *ippocampo* (Fig. 3.6) ad animale, alle seguenti coordinate:

AP: -3,8 mm

L:  $\pm 2,2$  mm

V: -3,3 mm

tb: -3,3 mm



**Fig. 3.6:** In verde sono mostrati i siti di iniezione della beta-amiloide 25-35 pre-aggregata o del veicolo (PBS1X sterile) corrispondenti all'ippocampo. [Modificata da Paxinos e Watson, 1998]

### 3.4.2 Test comportamentali

Quando gli animali hanno raggiunto i tre mesi di vita sono stati sottoposti ad una serie di test comportamentali. Per prima cosa ci si è assicurati che essi non presentassero disturbi motori o di coordinamento, e poi si è andati ad analizzare le loro prestazioni di apprendimento e memoria spaziale (in particolare riguardanti la *reference* e la *working memory*) utilizzando il *Morris Water Maze* (MWM). Questa procedura è stata introdotta da Morris nel 1984 [Morris, 1984] ed oggi è diventata uno dei test comportamentali d'elezione per lo studio del ruolo dei sistemi neurali nelle funzioni cognitive, in quanto è facile da riprodurre e permette di ottenere dei risultati abbastanza affidabili. Il MWM venne originariamente concepito per lo studio della memoria di riferimento spaziale, ma ad oggi sono state introdotte delle varianti per poter indagare anche altri aspetti della cognizione. In particolare in questa tesi, oltre alla versione classica del test, il MWM appunto, abbiamo utilizzato anche il *Radial Arm Water Maze* (RAWM), ovvero una di queste varianti creata per poter analizzare la memoria di lavoro (*working memory*).

La memoria di riferimento e quella di lavoro (che sono state indagate tramite i test comportamentali esposti in questa tesi) possono essere differenziate sulla base della maggiore o minore stabilità delle informazioni che contengono, in quanto la memoria di riferimento contiene tutto quello che l'animale apprende sullo spazio che lo circonda durante il test del MWM, mentre la memoria di lavoro contiene informazioni che gli sono utili solo per



un periodo limitato di tempo. La *reference memory* è definita come una memoria esplicita a lungo termine, tramite cui sono processate le informazioni che riguardano lo spazio e le relazioni che intercorrono tra le varie posizioni degli oggetti; mentre la *working memory* è un sistema per il mantenimento temporaneo dell'informazione e per la sua manipolazione allo scopo di eseguire differenti compiti cognitivi [Baddelay, 1986]

### **3.4.2.1 IL MORRIS WATER MAZE**

Il *Morris Water Maze* è utile per ottenere informazioni sulla capacità di orientamento spaziale degli animali e sulla velocità e accuratezza nell'apprendere una determinata posizione basandosi esclusivamente su riferimenti esterni allo spazio di nuoto (*extramaze cues*).

Durante l'esecuzione del test l'animale viene posto in una vasca riempita d'acqua, situata in un ambiente contenente oggetti (pannelli, luci, disegni), che egli può usare per orientarsi, al fine di localizzare una piattaforma sommersa.

L'animale una volta trovata la piattaforma, identifica gli stimoli spaziali che gli sono utili per orientarsi e ritrovarla durante le successive prove del test.

Un animale normale, con il ripetersi del test, migliora progressivamente sia il tempo trascorso che la distanza percorsa necessari per ritrovare la piattaforma in modo da poter uscire dall'acqua il più velocemente possibile. In presenza di deficit cognitivi alla *reference memory* invece gli animali non sono in grado di utilizzare i riferimenti spaziali per orientarsi e non riescono a migliorare le loro prestazioni di nuoto.

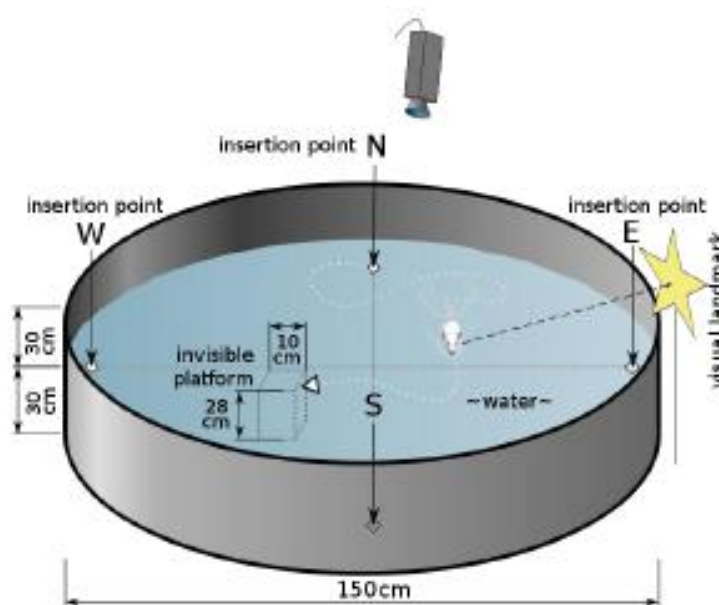
L'apparato sperimentale che è stato utilizzato per l'esecuzione del MWM test consiste in una vasca circolare di PVC di colore scuro, avente un diametro di 150 cm ed un'altezza di 60 cm, circondata da oggetti di varie forme e colori che possono essere utilizzati come riferimento spaziale dagli animali e che non vengono spostati per tutta la durata della sperimentazione. (Fig. 3.7)

Ai bordi della vasca vengono identificati 4 punti (N, S, W, E) che servono come siti di rilascio degli animali e che suddividono idealmente la vasca in quattro quadranti di uguali dimensioni (SW, NW, NE, SE). Al centro di ciascun quadrante è identificata un'area di circa 15 cm di diametro, denominata *annulus*, in mezzo alla quale può essere posta una piattaforma.

La vasca viene riempita con acqua a temperatura ambiente (20°C) fino a sommergere la piattaforma (10 cm di diametro per 28 cm di altezza), che viene posta al centro di uno dei quattro *annuli* (nel nostro caso SW). La piattaforma viene mantenuta sotto il livello dell'acqua di circa 2 cm, in modo che gli animali non la possano vedere, ma possano urtarvi contro nuotando.

La traiettoria di nuoto dell'animale viene registrata da una telecamera posta sul soffitto della stanza ed interfacciata ad un PC mediante un *software* di *videotracking* (Anitacker, DGTech).

Questo programma permette di calcolare il tempo (la latenza) in secondi, la distanza in metri e la velocità media che gli animali impiegano a trovare la piattaforma. L'analisi di questi dati invece viene fatta *offline* dallo sperimentatore.



**Fig. 3.7:** Rappresentazione schematica dell'apparato sperimentale utilizzato per l'esecuzione del MWM test.

Nei tre giorni precedenti all'inizio del MWM test gli animali vengono addestrati tramite *Cue test* a nuotare nella vasca, orientarsi nello spazio ed identificare una piattaforma contrassegnata da una bandierina, in modo da farli familiarizzare con l'ambiente per ridurre lo stress e capire se presentano deficit di tipo visuo-motori.

Durante il MWM test che dura 7 giorni consecutivi gli animali vengono sottoposti quotidianamente a 4 prove in cui vengono rilasciati, ogni giorno con ordine diverso, dai quattro punti cardinali della vasca, mentre la piattaforma rimane fissa al centro dell'*annulus* del quadrante SW. Ogni prova dura massimo 60 secondi, allo scadere dei quali l'animale, se non è stato in grado di raggiungere autonomamente la piattaforma, viene preso dallo sperimentatore e viene ivi posizionato per permettergli di orientarsi. Tra una prova e l'altra gli animali vengono lasciati riposare sulla piattaforma per circa 20 secondi, in maniera da dargli modo anche di esplorare lo spazio circostante prima di farli partire dal punto successivo.

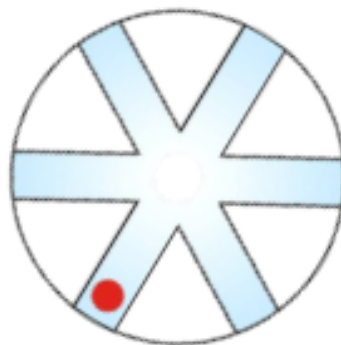
#### **3.4.2.2 LO SPATIAL PROBE TRIAL**

Durante l'ultimo giorno del MWM test, alla fine della quarta prova, la piattaforma viene rimossa dalla vasca e l'animale, rilasciato dal punto opposto in cui questa si trovava, viene fatto nuotare per un minuto. Questo trial viene definito *Spatial Probe Trial* (SPT) e serve a determinare l'accuratezza dell'apprendimento raggiunto dall'animale. In questo test

vengono considerate le percentuali di tempo trascorso e di distanza percorsa in ciascun quadrante ed anche il numero delle collisioni con gli *annuli* che ha effettuato l'animale.

### 3.4.2.3 IL RADIAL ARM WATER MAZE

Conclusi i 7 giorni di MWM test si è passati a valutare le capacità cognitive riguardanti la memoria di lavoro dei ratti in sperimentazione tramite il *Radial Arm Water Maze* (RAWM) test. Per l'esecuzione di questo test è stato usato un protocollo che dura 5 giorni e prevede l'introduzione nella stessa vasca usata per il MWM test di una serie di setti in plexiglass nero di 50 cm di lunghezza e 40 cm di altezza. I pannelli vengono fissati insieme in modo da creare un angolo di 60° tra loro, e poi incollati alle pareti della vasca così da ottenere sei corridoi simmetrici larghi 20 cm. La piattaforma viene mantenuta 2 cm sotto il livello dell'acqua, posizionata in fondo ad uno dei bracci del labirinto e lasciata fissa per un intero giorno di test, mentre cambia di posizione di giorno in giorno. (Fig. 3.8)



**Fig. 3.8:** Rappresentazione schematica della vasca utilizzata per il RAWM test che serve per la valutazione delle capacità di working memory.

Dalla figura si possono notare i 6 corridoi simmetrici (in azzurro) che costituiscono il labirinto acquatico e la piattaforma (qui indicata con un cerchio rosso) posizionata all'estremità di un braccio.

I ratti invece ogni giorno vengono rilasciati secondo un ordine casuale prestabilito dall'estremità dei cinque bracci che non contengono la piattaforma, svolgendo quindi 5 trials al giorno. Il loro scopo, come nel MWM classico, è quello di riuscire a trovare la piattaforma nascosta entro un tempo limite di 60 secondi. Quello che cambia è che non viene valutato il loro apprendimento tra i diversi giorni, ma tra i vari trials di uno stesso giorno.

In questo test vengono registrati ed analizzati il tempo che il ratto impiega a trovare la piattaforma e gli errori che compie quando entra in un braccio che non contiene la piattaforma e ne supera con il muso la metà. Quando l'animale non riesce a trovare da solo la piattaforma entro il minuto viene posizionato lì dallo sperimentatore e lo si fa orientare per una ventina di secondi prima di iniziare la prova successiva.

Nel corso dell'esecuzione di questo test l'animale deve elaborare le informazioni che ha acquisito nel tempo (le direttive del compito) per applicarle ad una nuova situazione (ogni giorno la piattaforma cambia posizione); deve pertanto operare un confronto tra le

contingenze attuali (trovare il “nuovo” braccio che contiene la piattaforma) e le azioni compiute di recente (ricordare quali bracci sono già stati visitati) ed adattare di conseguenza le sue risposte (cercare di non entrare dove non c'è la piattaforma). Ciò richiede all'animale un maggiore sforzo cognitivo rispetto ai processi propri della *reference memory* che fanno riferimento a situazioni che non variano nel corso dei vari trials.

Per l'analisi dei dati ottenuti dal RAWM test, oltre alle differenze relative tra i vari trials per quanto riguarda il tempo e gli errori effettuati, viene anche misurato il miglioramento dell'apprendimento che si ha tra il primo ed il secondo trial. Questo parametro, definito *savings* è calcolato tramite la seguente formula:

$$\text{Savings} = [(t1 - t2) / t1] * 100 \quad [\text{Netto et al, 1991}]$$

Dove  $t1$  è la media del tempo impiegato dagli animali per trovare la piattaforma durante il primo trial mentre  $t2$  è la media del tempo impiegato nel secondo trial.

## **3.5 PROCEDURE EX VIVO**

### **3.5.1 Sacrifici e processamento dei tessuti**

A circa 4 mesi di vita, alla fine del periodo dedicato ad i test comportamentali, gli animali sono stati sacrificati. Sono stati anestetizzati mediante iniezione i.p. di cloralio idrato (Fluka) al 5% usato alla dose di 7 ml/Kg e perfusi per via transcardica con 200 mL di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) tenuta a RT. I cervelli sono stati rapidamente rimossi e sono state asportate le regioni ippocampali e neocorticali d'interesse da un emisfero. Queste sono state congelate in ghiaccio secco e poi conservate a -80°C in attesa di future indagini neurochimiche e di immunoblotting, mentre il resto del tessuto cerebrale è stato fissato per immersione in una soluzione di paraformaldeide (PFA) al 4% in tampone fosfato (PB) per 24h. Il tessuto fissato è stato successivamente passato in una soluzione di saccarosio al 20% disciolto in tampone fosfato (PB) 0,1 M per minimo 24 h, e conservato a 4°C fino al momento del taglio.

I cervelli sono stati tagliati in sezioni coronali dello spessore di 30 um utilizzando un microtomo congelatore (Leitz Wetzlar) e sono state mantenute a -20°C in una soluzione di criopreservazione (antifreeze) fino al momento delle colorazioni istochimiche ed immunochimiche.

In seguito alle procedure istologiche descritte nei prossimi capitoli di questa tesi, le sezioni sono state montate su vetrini gelatinizzati, disidratate (tramite passaggio in soluzioni alcoliche di grado crescente) fino ad arrivare ad una soluzione di xilene 100%. A questo

punto i vetrini sono stati coperti tramite coprioggetto, utilizzando il DPX (Sigma) come montante, per poi essere osservati al microscopio.

### **3.5.2 Procedure istologiche**

#### **3.5.2.1 COLORAZIONE ISTOCHIMICA PER LA RILEVAZIONE DELLE FIBRE AChE-POSITIVE**

Per valutare gli effetti delle lesioni sull'innervazione colinergica delle regioni corticali ed ippocampali è stato seguito il protocollo di Hedreen [Hedreen et al, 1985] che permette la localizzazione selettiva dell'enzima acetilcolinesterasi (responsabile della degradazione dell'acetilcolina) nei neuroni e nei processi colinergici.

Le sezioni sono state prima lavate con tampone acetato a pH 6.0 e poi incubate con una soluzione di citrato di sodio, ferricianuro di potassio, solfato di rame e acetiltiocolina ioduro (Sigma) in sodio acetato al quale è stata aggiunta dell'etopropaziana (Sigma) per inibire le esterasi aspecifiche. In questo passaggio l'acetilcolinesterasi, grazie alla sua attività enzimatica, trasforma l'acetiltiocolina ioduro in tiocolina che a sua volta riduce il ferrocianuro di potassio, il quale crea un complesso di colore scuro con il rame. Nei successivi passaggi la colorazione viene intensificata mediante incubazioni con ammonio solfuro al 4% e nitrato d'argento al 0,1%.

#### **3.5.2.2 COLORAZIONE DI NISSL CON CRESIL VIOLETTO**

Questa tecnica è stata scoperta da Franz Nissl nel 1884, quando ancora studente notò la comparsa di granuli scuri intracellulari in sezioni di cervello trattate con blu di metilene (un colorante cationico basico).

Tale metodo permette di colorare i corpi cellulari dei neuroni, in particolare il reticolo endoplasmatico. Nel corso degli anni sono state introdotte delle variazioni al protocollo originale, utilizzando al posto del blu di metilene altri coloranti cationici basici come ad esempio l'anilina, la tionina, il blu di toluidina ed il cresil violetto. Tutte queste sostanze sono infatti in grado di colorare in blu l'RNA delle cellule (che caratteristicamente è acido, basofilo e carico negativamente), permettendo in tal modo la visualizzazione del reticolo endoplasmatico ruvido (la sostanza di Nissl) che appare blu scuro a causa della presenza di RNA ribosomiale su di esso. Inoltre, anche il DNA all'interno dell'nucleo assume un colore simile.

Per gli esperimenti di questa tesi abbiamo utilizzato questa procedura istochimica (utilizzando il cresil violetto come colorante) per trattare delle sezioni su cui precedentemente era stato effettuato un processo di immunochimica per la rilevazione degli

antigeni anti-tau-fosforilata, in modo da permettere la mappatura delle cellule presentanti immunoreattività.

### **3.5.2.2 IMMUNOISTOCHEMICA**

Su alcune sezioni, in base alla zona d'interesse e agli aspetti neuropatologici associati alle lesioni che si sono voluti indagare, sono state effettuate diverse colorazioni di immunoistochimica in *free-floating* utilizzando il complesso Avidina-Biotina-Perossidasi. In particolare, per il primo set d'esperimenti (*disfunzione della regolazione monoaminergica nel ratto*) sono state allestite delle procedure immunochimiche per la visualizzazione di marker colinergici (colina acetiltransferasi o ChAT), noradrenergici (dopamina beta-idrossilasi o DBH) o dopaminergici (tirosina idrossilasi o TH); mentre per il secondo set sperimentale (*effetti neuropatologici indotti da deplezione colinergica ed infusione ippocampale di beta-amiloide pre-aggregata nel ratto*) si è andati a valutare la presenza di marcatori associati all'attività colinergica (ChAT) e di antigeni specifici per la Tau-fosforilata in posizione 181 (Tau-P181Thr), la beta-amiloide 25-35 ed il TDP-43.

Il procedimento di immunoistochimica ha previsto per prima cosa l'inattivazione delle perossidasi endogene mediante l'incubazione delle fettine per 10 min in una soluzione di metanolo al 10% e perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% in tampone potassio fosfato (KPBS) a pH 7,4. Le sezioni sono state poi lavate in KPBS e preincubate per un'ora con del siero deplementato (derivante dalla stessa specie da cui viene prodotto anche l'anticorpo secondario) al 5% ed il Triton 100X (Sigma) allo 0,3% in KPBS. In seguito sono state esposte all'anticorpo primario diluito in siero al 2%, Triton 100X allo 0,3% e KPBS per 16-18 h a RT. Successivamente, dopo aver rimosso l'anticorpo primario non legato agli antigeni presenti nelle sezioni con del KPBS, queste sono state immerse per 2 h a RT in una soluzione costituita dall'anticorpo secondario biotinilato disciolto in siero al 2%, Triton 100X allo 0,3% e KPBS. Le sezioni sono poi state lavate dall'eccesso di anticorpo secondario con del KPBS ed incubate per un'ora assieme al complesso Avidina-Biotina (ABC kit - Vector) per aumentare il segnale. Alla fine è stata fatta sviluppare per 5 min la reazione tra la 3,3-diaminobenzidina (DAB - Sigma) concentrata allo 0,025% ed il perossido d'idrogeno allo 0,03%, che permette la rilevazione del segnale colorimetrico associato al complesso che si è creato tra gli anticorpi, l'avidina, la biotina e la perossidasi.

Di seguito viene riportata la tabella (Tab. 3.1) con tutti gli anticorpi utilizzati per le procedure di immunoistochimica che sono state effettuate.

ANTIGENE	ANTICORPO PRIMARIO	ANTICORPO SECONDARIO	SIERO
<b>DBH</b>	ms anti-DBH [1:2000]	hs anti-ms [1:200]	NHS
<b>TH</b>	rb anti-TH [1:2000]	gt anti-rb [1:300]	NGS
<b>ChAT</b>	ms anti-ChAT [1:1000]	hs anti-ms [1:200]	NHS
<b>Tau-P181Thr</b>	ms anti-Tau-P181Thr [1:200]	hs anti-ms [1:200]	NHS
<b>beta-amiloide 25-35</b>	rb anti-beta-amiloide 25-35 [1:000]	gt anti-rb [1:300]	NGS
<b>TDP-43</b>	rb anti-TDP-43 [1:1000]	gt anti-rb [1:300]	NGS

**Tab. 3.1:** In tabella sono riportati gli anticorpi, primari e secondari, ed i sieri utilizzati per le procedure di immunochimica. Dove: ms=topo; hs=cavallo; rb=coniglio; gt=capra; mentre NXS=normal X serum, in cui X rappresenta la specie in cui è stato prodotto il siero (H=cavallo; G=capra). Tutti gli anticorpi secondari utilizzati sono biotinilati.

### 3.5.3 Analisi microscopiche

Le sezioni così processate sono state osservate tramite microscopio Nikon H550L e fotografate usando una fotocamera digitale ProgRes.

In particolare, per quanto riguarda il primo set di esperimenti (*disfunzione della regolazione monoaminergica nel ratto*) si è andati ad analizzare gli effetti delle lesioni sull'innervazione corticale ed ippocampale; e sulla sopravvivenza cellulare nei nuclei colinergici del *prosencefalo di base* (MS, DBB e NBM), nel complesso noradrenergico LC/SubC e dei neuroni dopaminergici della VTA. Per quanto riguarda il secondo set sperimentale (*effetti neuropatologici indotti da deplezione colinergica ed infusione ippocampale di beta-amiloide pre-aggregata nel ratto*), sono stati ricercati i segni neuropatologici (aumento della forma fosforilata della proteina tau, accumulo di TDP-43 nel citoplasma, presenza di depositi di aggregati di beta-amiloide) indotti dai due tipi di trattamento nelle zone della corteccia frontale e dell'ippocampo, oltre ad osservare gli effetti di questi sull'innervazione colinergica ed i suoi nuclei di origine.

### 3.5.4 Analisi con Western Blot

Tramite la tecnica del Western Blot è possibile identificare delle proteine all'interno di un tessuto specifico e fare un'analisi semi-quantitativa di esse.

Quindi è stato deciso di usare questa metodica per analizzare il contenuto proteico degli ippocampi prelevati dagli animali lesionati con 192-IgG-sap nei nuclei colinergici del *prosencefalo di base* e/o inoculati con beta-amiloide 25-35. In particolare è stata indagata la presenza delle seguenti proteine: APP, TAU, TAU-P181 e TDP-43.

Qui di seguito viene riportato il procedimento che è stato utilizzato per la rilevazione degli antigeni e la quantificazione dei livelli di proteine.

#### **3.5.4.1 PREPARAZIONE DEI TESSUTI**

I frammenti di tessuto ippocampale, prelevati durante i sacrifici e conservati a -80°C, sono stati immersi in tampone RIPA (costituito da NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, NP-40 all'1%, SDS allo 0,1%, DOC allo 0,5% e EDTA 5Mm), a cui sono stati aggiunti degli inibitori delle proteasi, ed omogeneizzati mediante un omogeneizzatore (Ultra-Turrax). I campioni sono stati poi sonicati per 20 secondi ed infine centrifugati per 15min a 14000 rpm. Il surnatante che ne è risultato è stato prelevato, posto in ghiaccio per 20 minuti ed il contenuto proteico è stato quantificato tramite NanoDrop (misurando l'assorbanza a 280 nm) per essere poi processato tramite immunoblotting.

#### **3.5.4.2 SEPARAZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE ELETTROFORESI SU SDS-PAGE**

La separazione delle proteine è stata fatta tramite gel di poliacrilamide al 10% preparato in SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,1%. Questo gel, posto in verticale, presenta una prima parte chiamata *stacking gel* dove la miscela proteica viene compattata, ed una seconda parte chiamata *running* o *separating gel* in cui avviene la separazione elettroforetica delle proteine in base al loro peso molecolare.

Le aliquote utilizzate per il caricamento dei campioni sul gel, sono state preparate utilizzando un volume corrispondente a 20 mg di proteine a cui è stato aggiunto il buffer di caricamento (*loading buffer*) per ridurre i legami disolfuro.

I campioni così preparati sono stati denaturati in un blocco riscaldante a 100°C e poi caricati nei diversi pozzetti creati nel gel con un pettinino di plastica. Accanto ai campioni è stato caricato anche un apposito *ladder*, che costituendo una scala graduata, permette la detenzione del peso molecolare delle diverse proteine che vengono separate con questa tecnica.

La corsa su gel è stata effettuata applicando un campo elettrico e creando una differenza di potenziale di 35 V nella fase *stacking* del gel, e di 50 V in quella di *separating*. Le proteine in questo modo migrano dal polo negativo del gel a quello positivo, separandosi in base al loro peso molecolare.



### **3.5.4.3 BLOTTING IN CAMERA DI TRASFERIMENTO**

Dopo la corsa, i gel vengono posizionati nei *transfer sandwiches*, costituiti esternamente da supporti in plastica all'interno dei quali vengono posti in sequenza: un foglio di spugna, della carta da filtro 3 mm, il gel con le proteine separate, una membrana di nitrocellulosa, di nuovo della carta da filtro 3 mm ed un altro foglio di spugna. I *transfer sandwiches* così costituiti, vengono quindi immersi nel buffer di trasferimento che si trova dentro la camera di trasferimento che serve per il *blotting*. A questo punto, creando una differenza di potenziale le proteine (cariche negativamente) tendono a migrare verso il polo positivo, finchè non incontrano la membrana di nitrocellulosa che le blocca e le lega a sè.

### **3.5.4.4 RICONOSCIMENTO DEGLI ANTIGENI E SVILUPPO DELLE LASTRE**

Le membrane che legano le proteine vengono recuperate ed incubate over-night in agitazione a RT in una soluzione di *blocking* contenente PBS1X, BSA al 3%, TWEEN allo 0,1% ed inibitori delle fosfatasi, per bloccare i siti di legami aspecifici a cui potrebbero legarsi gli anticorpi e per evitare la perdita dei gruppi fosfato associati alle proteine d'interesse. In seguito le membrane vengono esposte per un'ora all'azione dell'anticorpo primario (Tab. 3.2) opportunamente diluito in PBS1X, BSA al 3% e TWEEN allo 0,1%. Poi vengono effettuati tre lavaggi di 5 min ciascuno con PBS1X e TWEEN 0,5% e le membrane vengono messe ad incubare per un'ora con un anticorpo secondario coniugato alla perossidasi del rafano (HRP) (Tab. 3.2) e diluito in PBS1X, BSA al 3% e TWEEN allo 0,1%. Alla fine di questa incubazione le membrane vengono lavate ancora tre volte con PBS1X e TWEEN 0,5% ed infine solo con PBS1X.

A questo punto è possibile visualizzare gli antigeni d'interesse tramite un substrato luminescente: il luminolo, che viene ossidato in condizioni alcaline dalla perossidasi del rafano. Le membrane infatti vengono esposte per 3 minuti ad una soluzione contenente il luminolo (Pierce ECL Western Blotting Substrate - Thermo Scientific), che crea una reazione di chemiluminescenza. Questa, in stanza oscura (dove tutto viene fatto rigorosamente al buio), viene impressa su delle lastre fotografiche (Kodak) con dei tempi d'esposizione variabili. Le lastre vengono poi immerse in una soluzione di sviluppo e poi in una di fissaggio per permetterne lo sviluppo e la detenzione delle bande proteiche.

ANTIGENE	ANTICORPO PRIMARIO	ANTICORPO SECONDARIO
APP	ms anti-APP [1:200]	HRP anti-ms [1:2000]
TAU	ms anti-TAU [1:100]	HRP anti-ms [1:2000]
TAU-P181Thr	ms anti-TAU-P181Thr [1:100]	HRP anti-ms [1:2000]
TDP-43	rb anti-TDP-43 [1:1000]	HRP ant-rb [1:2000]
beta-tubulina	ms anti-beta-tubulina [1:10000]	HRP anti-ms [1:2000]

**Tab. 3.2:** In tabella sono indicati gli anticorpi primari e secondari utilizzati per l'immunoblotting e le rispettive diluizioni di lavoro. La beta-tubulina è una proteina house-keeping che viene utilizzata come controllo.

#### 3.5.4.5 ANALISI DENSITOMETRICHE

Le lastre fotografiche ottenute dai Western Blot sono state scannerizzate (SNAPSCAN 1212u, Agfa) per poi poter valutare la densità delle bande proteiche tramite analisi densitometrica computerizzata (effettuata tramite Image).

#### 3.5.5 Analisi statistiche

I dati ottenuti delle analisi comportamentali e da quelle istochimiche e neurochimiche sono stati valutati mediante un test di analisi della varianza (ANOVA), sia fattoriale (*oneway* ANOVA) che sia per misure ripetute (*repeated measures* ANOVA), affiancate, dove risultasse appropriato, da un *Fisher's PLSD post-hoc test* per confronti appaiati.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software Statview 4.0 per Macintosh (JMP, Cary) e le differenze sono state considerate significative per  $p < 0,05$ .

## **4. Risultati**

### **4.1 DISFUNZIONE DELLA REGOLAZIONE MONOAMINERGICA NEL RATTO**

#### **4.1.1 Analisi funzionali**

Nei soggetti lesionati non sono stati rilevati cambiamenti nel peso corporeo rispetto al gruppo dei controlli o altri segni che rilevassero uno stato di sofferenza.

Tramite il Cue-test è stato constatato che nessuno degli animali utilizzati per questo set di esperimenti ha riportato disturbi di tipo visivo o motorio, perciò i deficit che andremo ad analizzare nei prossimi capitoli di questa tesi possono essere associati esclusivamente alle capacità cognitive e non sono dovuti all'influenza di alterazioni di altro tipo.

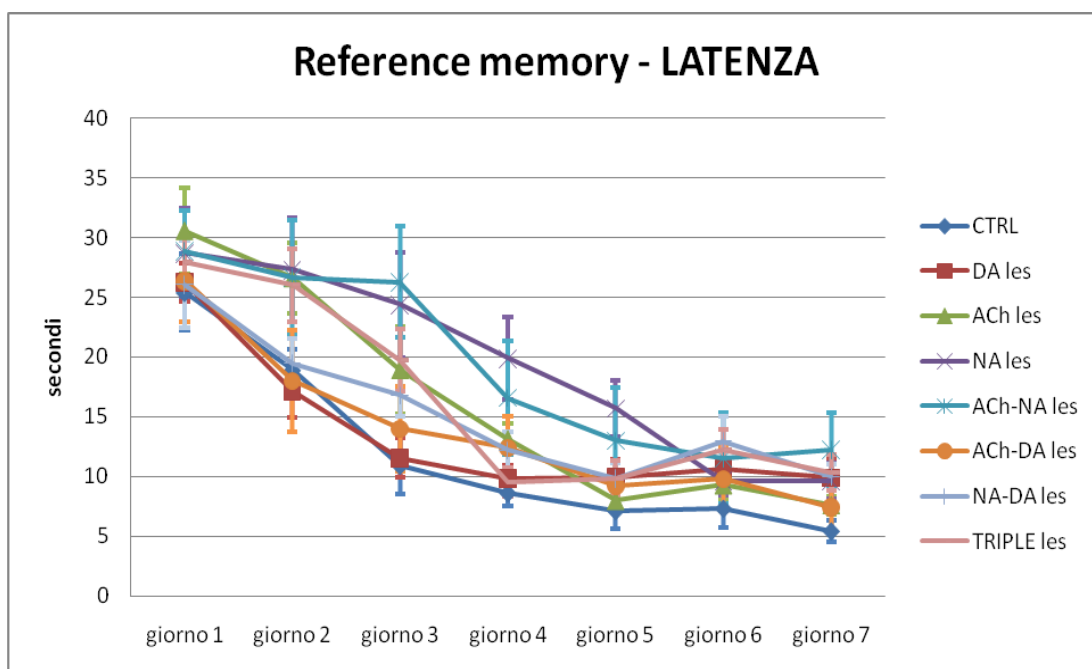
La velocità natatoria media degli animali è risultata essere abbastanza simile tra i vari gruppi, con valori compresi tra i 0,2-0,3 m/s (dati non presentati).

Gli animali intatti e quelli trattati con veicolo (PBS1X sterile) non hanno mostrato differenze di comportamento in nessuno dei test effettuati, perciò per le analisi sono stati raggruppati in uno stesso gruppo definito "controlli" (CTRL).

##### **4.1.1.1 REFERENCE MEMORY**

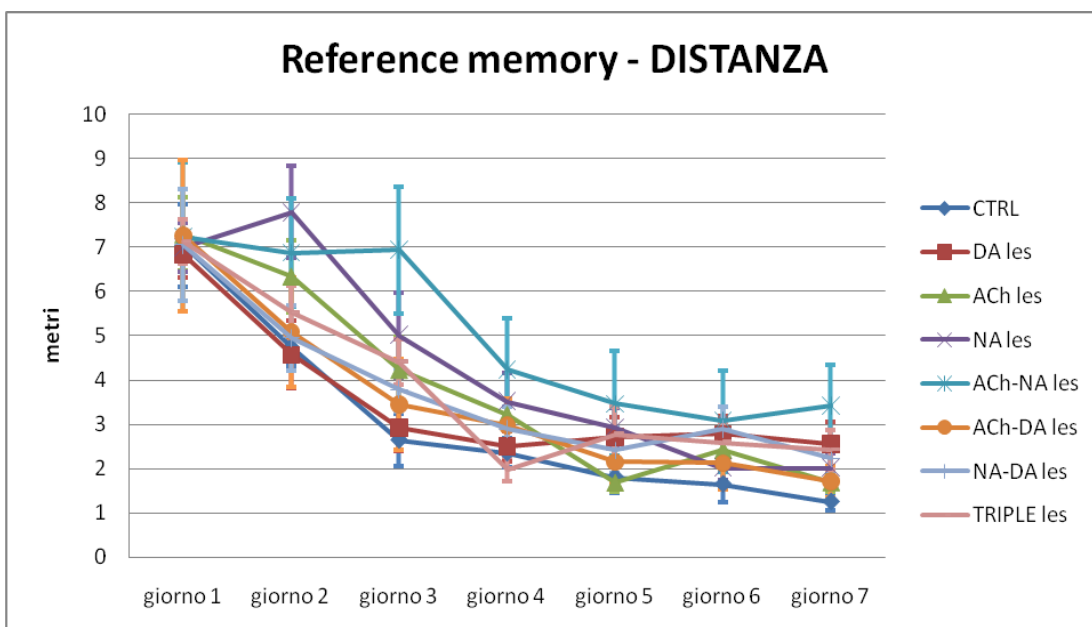
I tempi medi impiegati dagli animali durante l'esecuzione del *Morris Water Maze* (MWM) test per raggiungere la piattaforma nascosta sono mostrati in Fig. 4.1.

Si nota che durante il primo giorno di test gli animali raggiungono il loro target mediamente dopo 25-30 secondi da quando vengono messi in acqua; mentre l'ultimo giorno riescono a trovare la piattaforma anche dopo 5-10 secondi, senza particolari differenze tra i vari gruppi. Quindi, tutti gli animali il settimo giorno di test sono in grado di trovare la piattaforma nel minor tempo possibile. Delle differenze possono essere però osservate durante il processo di apprendimento che intercorre tra il primo ed il quinto giorno di test. Come infatti si vede dai tracciati del grafico della latenza (Fig. 4.1) tutti gli animali migliorano la loro prestazione nel tempo, ma mentre quelli appartenenti al gruppo dei controlli e coloro che hanno ricevuto la lesione dopaminergica (DA les, ACh-DA les, NA-DA les) imparano molto velocemente, dimezzando il tempo tra il primo ed il secondo giorno, e raggiungendo già al quarto il livello di plateau che manterranno fino al settimo; gli animali con lesione colinergica e noradrenergica concomitante (TRIPLE les, ACh-NA les) o singola (ACh les, NA les) raggiungono i valori più bassi di latenza solo dal quinto giorno in poi, e durante i primi tre giorni di test mostrano solo un lieve miglioramento, queste differenze osservate comunque non sono significative in quanto è presente un'ampia variabilità all'interno di tali gruppi.



**Fig. 4.1:** Analisi funzionale della memoria di riferimento spaziale indagata tramite MWM test in animali che hanno ricevuto dei trattamenti lesivi al sistema dopaminergico e/o colinergico e/o noradrenergico. In figura sono riportati i tracciati che rappresentano il tempo medio (calcolato in secondi) impiegato dagli animali per trovare la piattaforma durante i 7 giorni di test.

Analizzando la distanza percorsa dagli animali per trovare la piattaforma sommersa durante il MWM test si può osservare uno scenario abbastanza simile (Fig. 4.2).



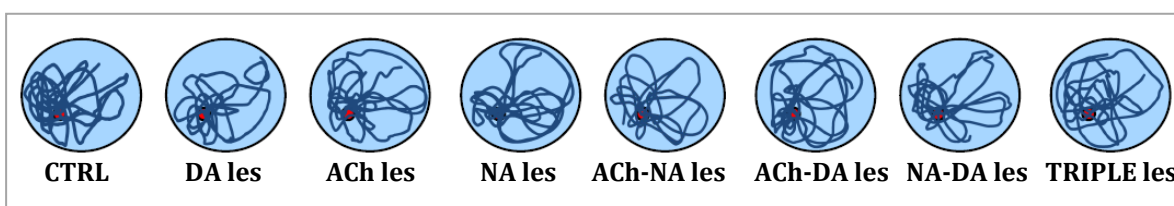
**Fig. 4.2:** Analisi funzionale della memoria di riferimento spaziale indagata tramite MWM test in animali che hanno ricevuto dei trattamenti lesivi al sistema dopaminergico e/o colinergico e/o noradrenergico. In figura sono riportati i tracciati che rappresentano la distanza media (calcolata in metri) percorsa dagli animali per raggiungere la piattaforma durante i 7 giorni di test.

Tutti gli animali il primo giorno di test nuotano per circa 7 metri prima di trovare la piattaforma, mentre dal quinto giorno in poi ne percorrono in media meno di 2 (metri).

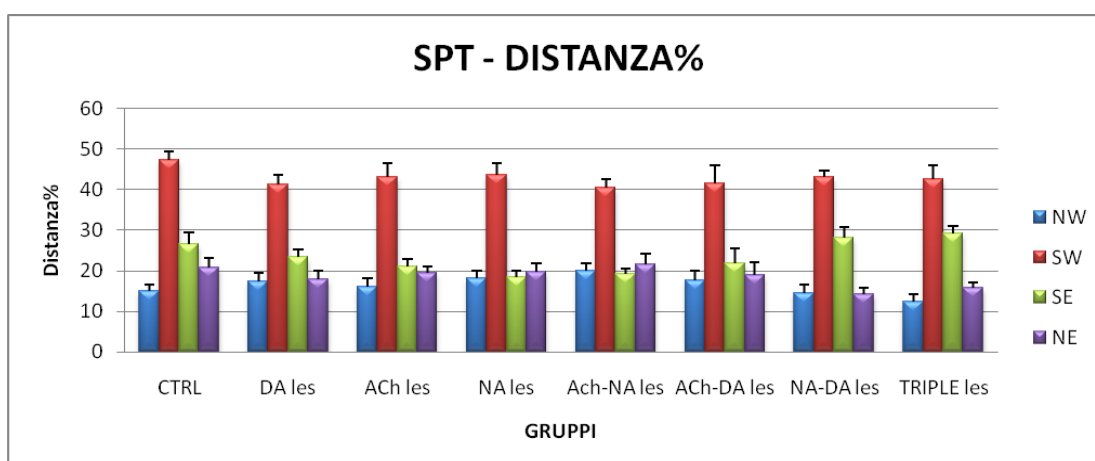
Anche in questo caso si osserva una lentezza nell'apprendimento per quanto riguarda i gruppi NA les, ACH-NA les, ACh les e TRIPLE les durante i primi tre giorni di test, ma già a partire dal quarto giorno le performance si presentano abbastanza simili a quelle degli altri animali, queste differenze comunque non sono significative.

#### 4.1.1.2 ACCURATEZZA DELL'APPRENDIMENTO

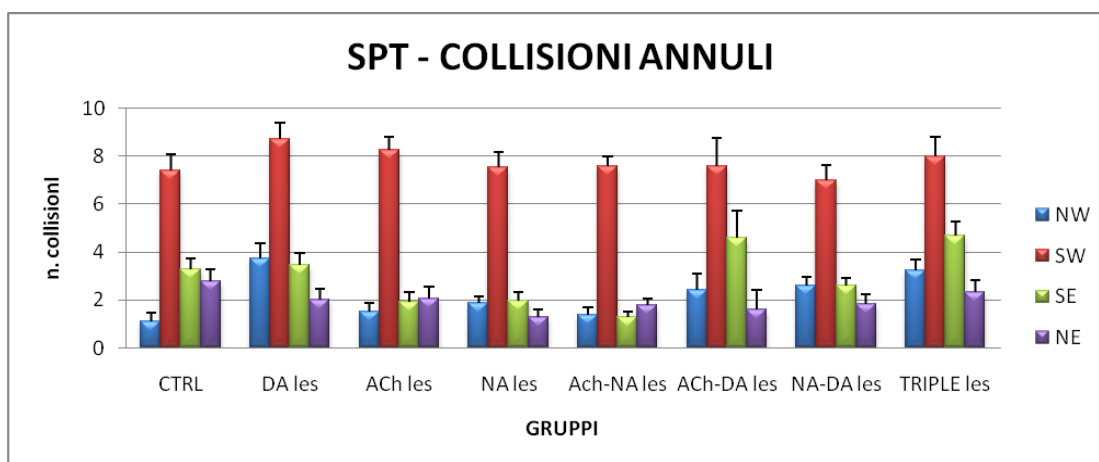
Come si può osservare dai tracciati di nuoto (Fig. 4.3) registrati durante lo *Spatial Probe Trial* (SPT), dopo il settimo giorno di MWM test, gli animali presentano una strategia di ricerca spaziale simile. Tutti quanti hanno infatti raggiunto lo stesso livello di apprendimento, e tendono a nuotare preferibilmente nel quadrante dove era posta la piattaforma durante il MWM test (SW), come si vede dal grafico che rappresenta la percentuale di distanza percorsa nei differenti quadranti in cui è divisa virtualmente la vasca (Fig. 4.4). Inoltre effettuano tutti un numero significativamente maggiore di collisioni con l'*annulus* corrispondente alla precedente posizione della piattaforma (SW) rispetto agli altri tre, come si osserva in Fig. 4.5.



**Fig. 4.3:** Tracciati di nuoto (linee blu scuro) rappresentativi per gruppo testato, registrati durante lo SPT. Il cerchio rosso raffigura la posizione della piattaforma durante il MWM test e corrisponde all'*annulus* all'interno del quadrante di SW della vasca.



**Fig. 4.4:** Questi istogrammi rappresentano la distanza percentuale media che ogni gruppo ha percorso nei quattro quadranti in cui è suddivisa virtualmente la vasca durante lo SPT della durata di un minuto. Come si vede nel grafico tutti gli animali nuotano prevalentemente nel quadrante di SW, quello in cui durante i precedenti 7 giorni di MWM test era posizionata la piattaforma.



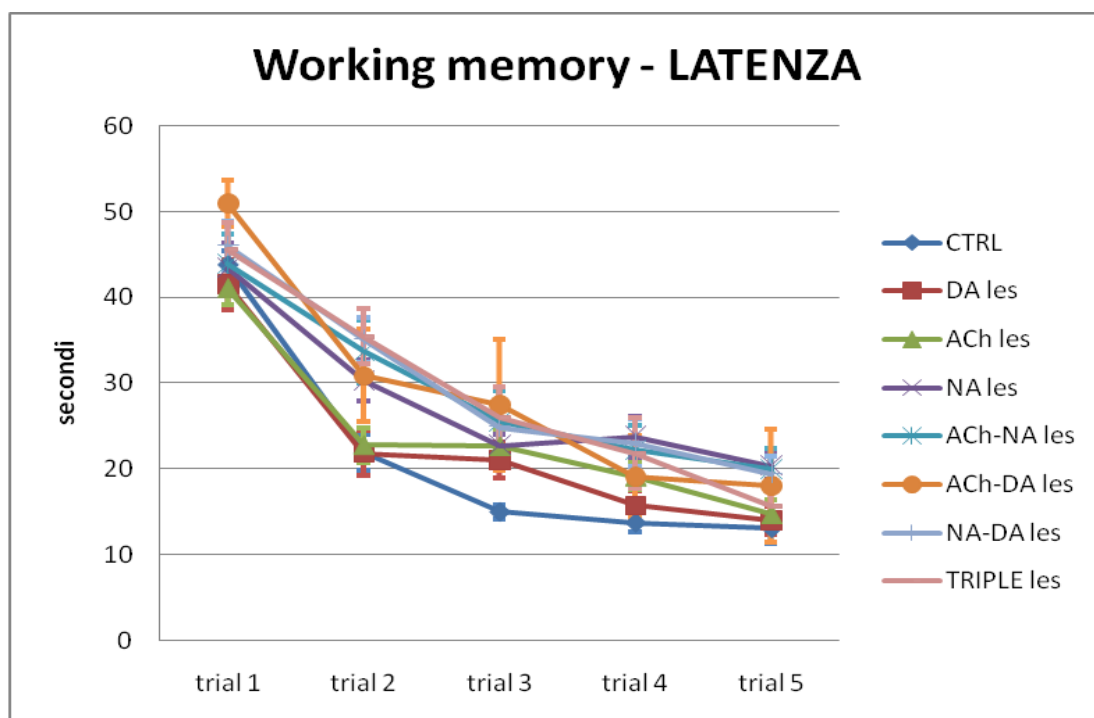
**Fig. 4.5:** Questi istogrammi rappresentano il numero medio di collisioni effettuate per gruppo testato durante lo SPT. Tutti gli animali, nel minuto a disposizione, tendono a dirigere il loro nuoto verso l'annulus in cui nei trials precedenti veniva posizionata la piattaforma (quello di SW), dimostrando un livello di apprendimento spaziale simile.

#### 4.1.1.3 WORKING MEMORY

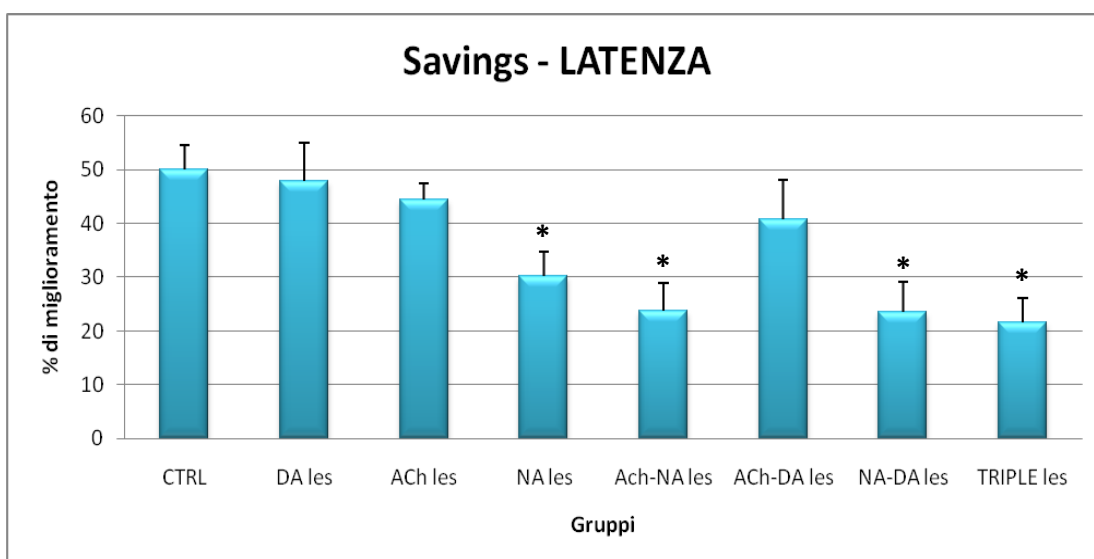
La capacità di memoria di lavoro degli animali lesionati al sistema dopaminergico e/o colinergico e/o noradrenergico è stata analizzata tramite il *Radial Arm Water Maze* (RAWM) test e rapportata alle performance di animali di controllo.

Dall'analisi della latenza è emerso che tutti gli animali sono in grado di migliorare progressivamente dalla prima alla quinta prova del test, impiegando un tempo medio compreso tra i 40 ed i 50 secondi nel primo trial fino ad arrivare a raggiungere la piattaforma tra i 15 ed i 20 secondi nell'ultimo (Fig. 4.6).

Delle differenze significative tra gruppi compaiono però quando si va ad analizzare il modo in cui gli animali imparano a svolgere questo compito. In particolare esiste un'ampia discrepanza tra la velocità d'apprendimento che avviene tra il primo ed il secondo trial. Come si può infatti notare in Fig. 4.6, nel secondo trial tutti i gruppi che presentano la lesione noradrenergica (NA les, ACh-NA les, NA-DA les, TRIPLE les) impiegano più tempo a completare il compito (dai 10 ai 15 secondi in più rispetto ai controlli). Inoltre, come emerge anche dall'analisi dei *Savings* per la latenza, la percentuale del loro miglioramento in questa fase è significativamente ( $p < 0,05$ ) più bassa rispetto agli altri gruppi, infatti non oltrepassa il 20-30% contro il 50% raggiunto invece dai controlli (Fig. 4.7).



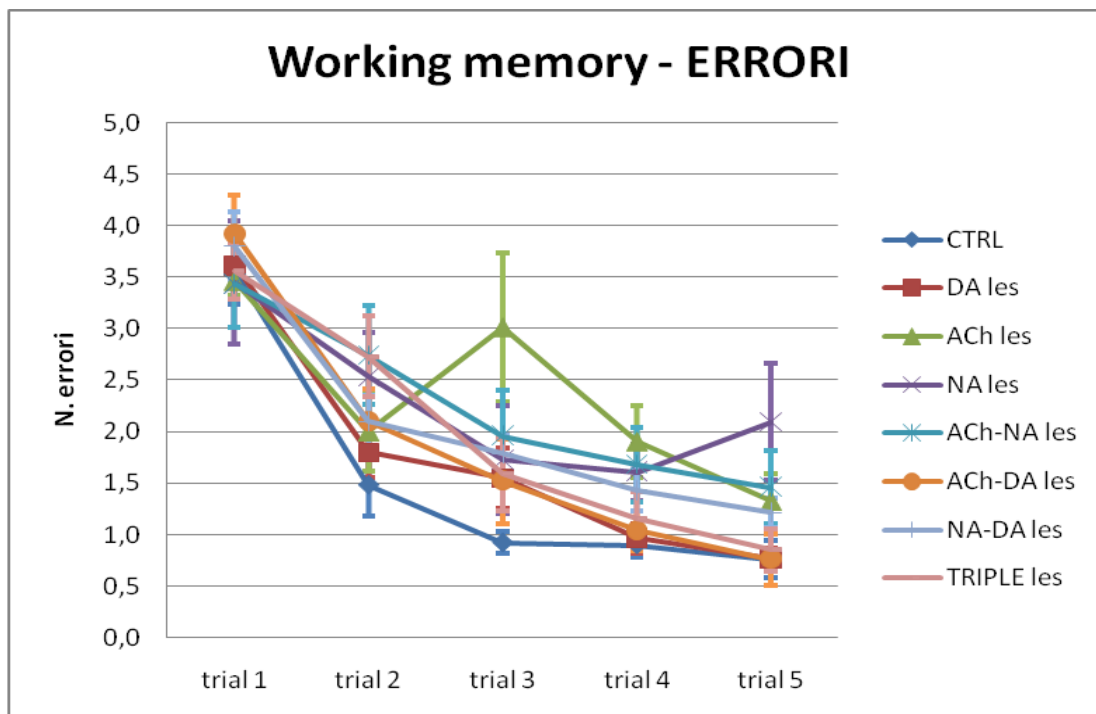
**Fig. 4.6:** Analisi funzionale della memoria di lavoro indagata tramite RAWM test in animali che hanno ricevuto dei trattamenti lesivi al sistema dopaminergico e/o colinergico e/o noradrenergico. In figura sono riportati i tracciati che rappresentano il tempo medio (calcolato in secondi) impiegato dagli animali per trovare la piattaforma durante i 5 trials che vengono effettuati ogni giorno per 5 giorni.



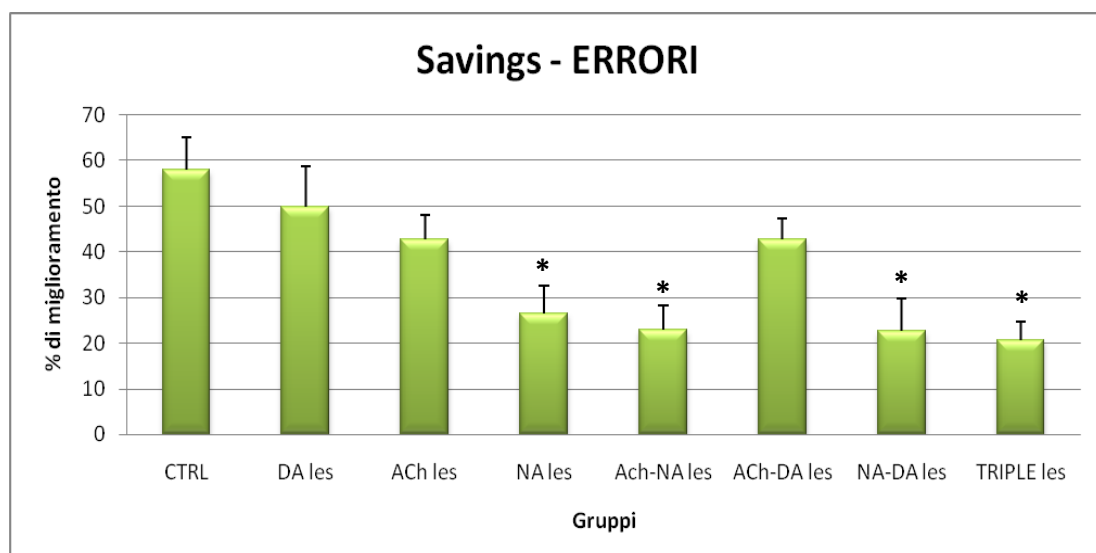
**Fig. 4.7:** Questo grafico mostra il risultato dell'analisi dei Savings per quanto riguarda la latenza, cioè la percentuale di miglioramento che i gruppi presentano tra il primo ed il secondo trial. Qui si vede chiaramente come tutti i gruppi che sono stati soggetti a deplezione del sistema noradrenergico presentino dei deficit maggiori ad eseguire il RAWM test, un compito che richiede l'integrità della memoria di lavoro. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

Risultati simili sono stati ottenuti anche dall'analisi degli errori in cui gli animali sono incorsi durante il RAWM test. Tutti gli animali lesionati al sistema noradrenergico (NA les, ACh-NA les, NA-DA les, TRIPLE les) tendono mediamente a fare un errore in più rispetto ai controlli durante il secondo ed il terzo trial del RAWM test (Fig. 4.8), e come si può vedere

dall'analisi dei *Savings* (Fig. 4.9) il loro miglioramento in termini d'errori tra la prima e la seconda prova è significativamente ( $p < 0,05$ ) minore rispetto ai controlli (20-25% contro 60%). Questi risultati fanno quindi supporre un importante coinvolgimento del sistema noradrenergico nel corretto funzionamento della *working memory*.



**Fig. 4.8:** Analisi funzionale della memoria di lavoro indagata tramite RAWM test in animali che hanno ricevuto dei trattamenti lesivi al sistema dopaminergico e/o colinergico e/o noradrenergico. In figura sono riportati i tracciati che rappresentano la media degli errori effettuati dai gruppi durante le 5 prove del test.



**Fig. 4.10:** Questo grafico evidenzia il risultato ottenuto dall'analisi dei *Savings* per quanto riguarda gli errori, mostrando la percentuale di miglioramento tra la prima e la seconda prova del test. I gruppi che hanno ricevuto la lesione al sistema noradrenergico migliorano solo del 20-25% contro il 60% raggiunto dai controlli. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )



## **4.1.2 Analisi istologiche**

### **4.1.2.1 EFFETTI ANATOMICI DELLE LESIONI**

Per verificare l'efficacia e la specificità delle lesioni ottenute tramite le due immunotossine, 192-IgG-sap ed anti-DBH-sap, inoculate nei ventricoli laterali di animali neonati e della neurotossina 6-OHDA iniettata localmente nella VTA di animali adulti; sono state fatte una serie di colorazioni istochimiche ed immunochimiche atte a rilevare i marcatori cellulari d'interesse.

I neuroni colinergici del *prosencefalo di base* sono stati rilevati tramite un'immunoistochimica anti-ChAT (anti-colina acetiltransferasi), diretta contro l'enzima che catalizza la reazione tra l'acetil coenzima A e la colina per la formazione dell'acetilcolina (ACh). Quest'enzima si trova solamente nel soma dei neuroni colinergici dove viene appunto prodotta l'ACh e quindi costituisce un marker d'elezione per la loro analisi istochimica. Al microscopio sono state poi analizzate le zone delle sezioni cerebrali contenenti il MS e la DBB, e quelle che comprendevano il NBM. In tutte queste zone si è osservata una deplezione pari a circa il 75% dei corpi cellulari colinergici negli animali che avevano ricevuto l'infusione della 192-IgG-sap da neonati (ACh les, ACh-DA les, ACh-NA les, TRIPLE les), mentre questi nuclei rimanevano integri in tutti gli animali trattati con le altre tossine. In Fig. 4.11, nella colonna di sinistra, vengono riportate a scopo esemplificativo solo le sezioni contenenti il MS e la DBB, mentre le foto che riguardano il NBM non sono mostrate.

L'innervazione colinergica ippocampale e corticale è stata invece evidenziata per mezzo di una colorazione istochimica specifica per l'acetilcolinesterasi (AChE), l'enzima addetto alla degradazione dell'ACh nei terminali sinaptici, localizzato principalmente sulle fibre dei neuroni colinergici. La denervazione colinergica così osservata è risultata essere del 70-80% negli animali lesionati con la 192-IgG-sap rispetto a quelli di controllo, mentre non erano presenti danni morfologici evidenziabili negli animali lesionati con le altre due sostanze. In figura 4.11, nella colonna di sinistra, vengono riportati i particolari dell'innervazione colinergica del giro dentato dell'ippocampo appartenenti ai diversi gruppi analizzati. Come si può vedere, solo gli animali lesionati con l'immunotossina 192-IgG-sap presentano la perdita delle fibre AChE-positive nel DG.

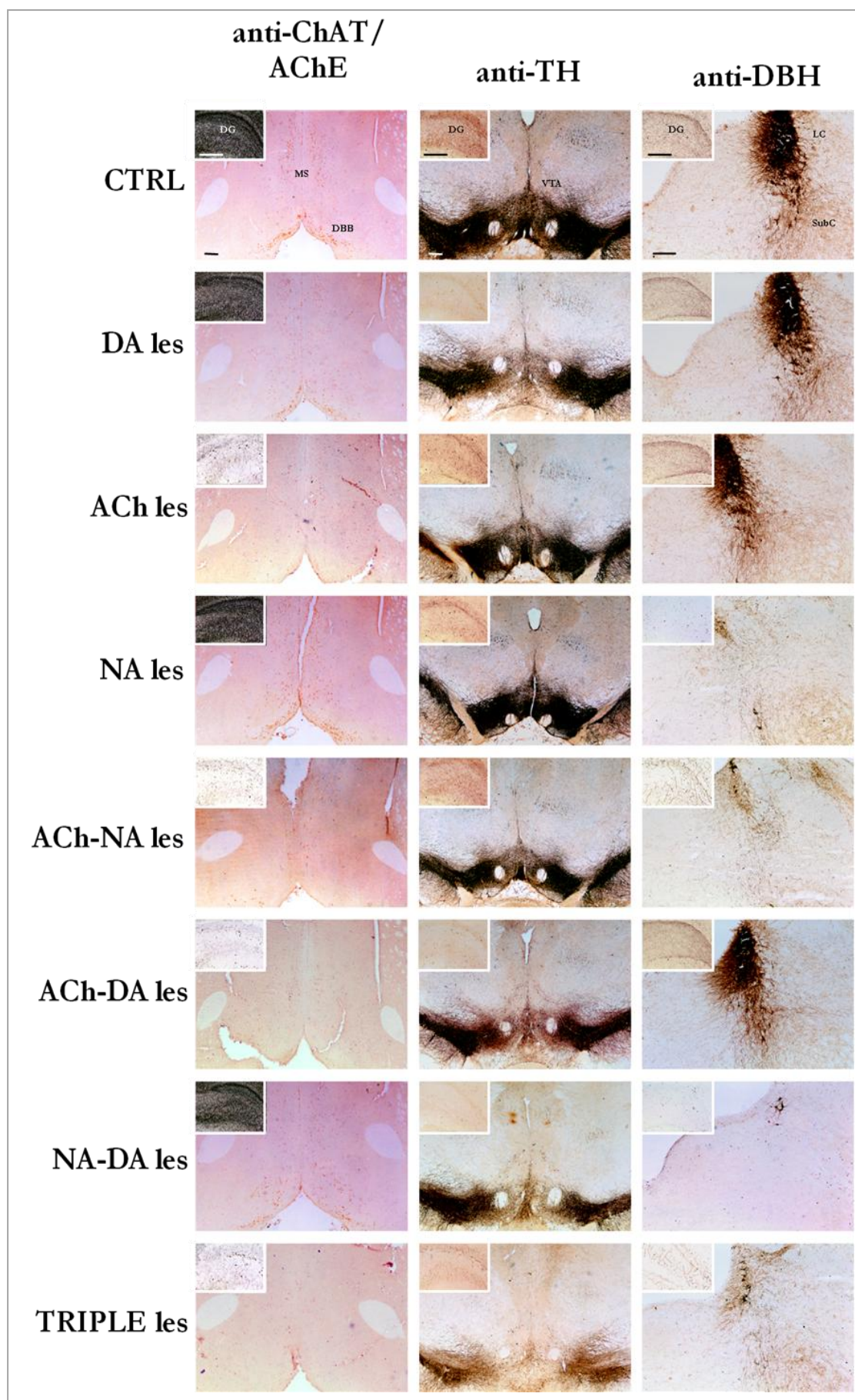
I neuroni dopaminergici appartenenti alla VTA invece sono stati analizzati tramite una colorazione immunoistochimica diretta contro la tirosina idrossilasi (TH), l'enzima che catalizza la trasformazione dell'amminoacido tirosina in L-DOPA (L-di-idrossifenilalanina), precursore in sequenza della dopamina, della noradrenalina e dell'adrenalina, contenuto sia nel soma che nelle parti terminali dei neuroni monoaminergici. [Nagatsu e Levitt, 1964] In questo modo è stato possibile verificare la corretta localizzazione della lesione, in quanto il nostro intento era quello di "colpire" solo i neuroni dopaminergici della VTA e non quelli della

limitrofa SN. Nella zona di nostro interesse si è quindi osservata una deplezione dopaminergica pari al 40-50% negli animali che hanno ricevuto l'infusione di 6-OHDA singola o in combinazione con la 192-IgG-sap (DA les, ACh-DA les) in confronto ai controlli, mentre la perdita neuronale è risultata più massiva negli animali trattati anche con l'immunotossina noradrenergica anti-DBH-sap, in cui si è visto un decremento del 60% nei doppi (NA-DA les) ed anche del 70% nei tripli lesionati (TRIPLE les). (Fig. 4.11, colonna centrale) La maggiore deplezione dopaminergica osservata in questi ultimi due gruppi potrebbe indicare che la mancanza di fibre noradrenergiche che innervano la VTA renda i neuroni dopaminergici di quest'area più suscettibili all'insulto tossico dato dall'iniezione locale della 6-OHDA.

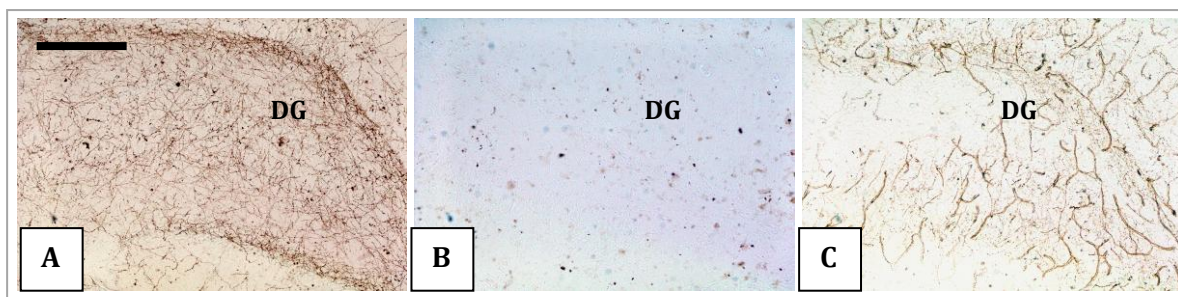
Risultati simili sono stati osservati analizzando al microscopio l'immunoreattività per TH dell'innervazione dopaminergica mesocorticolimbica, che raggiunge le aree prefrontali, fronto-parietali e l'ippocampo. In figura 4.11, nella colonna centrale, sono riportati i particolari del DG dell'ippocampo in cui si può vedere un marcato decremento di fibre dopaminergiche in tutti i gruppi di animali trattati con la 6-OHDA.

Gli effetti delle lesioni sui neuroni noradrenergici del complesso LC/SubC e sull'innervazione che da esso diparte sono stati analizzati invece tramite una colorazione immunoistochimica anti-DBH (anti-dopamina beta-idrossilasi), cioè diretta contro l'enzima responsabile della conversione della dopamina in noradrenalina, che si localizza sia nei corpi cellulari che nei terminali di questi neuroni. Come si può vedere nella colonna di destra della Fig. 4.11, la somministrazione dell'immunotossina anti-DBH-sap in animali neonati determina una riduzione dell'immunoreattività per questo marcatore noradrenergico del 90-95% rispetto alla condizione degli animali di controllo, sia a livello dei corpi cellulari che delle fibre che raggiungono la corteccia e l'ippocampo (l'effetto sull'innervazione DBH-positiva che raggiunge il DG è mostrato nei particolari della colonna di destra della Fig. 4.11).

E' da notare che la somministrazione dell'immunotossina 192-IgG-sap singola (gruppo ACh les) o in combinazione con la 6-OHDA (gruppo ACh-DA les), non provoca effetti morfologici e quantitativi nè sui corpi cellulari del LC e nemmeno sull'innervazione noradrenergica che raggiunge il DG in confronto ai controlli, mentre se avviene in concomitanza al trattamento con l'immunotossina anti-DBH-sap (gruppi ACh-NA les e TRIPLE les) provoca la comparsa nell'ippocampo di grosse fibre DBH-positive. (Fig. 4.11, nei particolari della colonna di destra; ed in Fig. 4.12) Questi processi, che non derivano dal *Locus Coeruleus*, potrebbero provenire dal ganglio cervicale superiore (SCG) ed essere attratti verso l'ippocampo da fattori di crescita locali (quale ad esempio il fattore di crescita neuronale o NGF) resisi disponibili in seguito all'attivazione di meccanismi di compensazione indotti dalla perdita di fibre colinergiche (causata dalla lesione con 192-IgG-sap). Questa iperinnervazione noradrenergica ectopica non pare comunque avere effetti sul recupero funzionale, come visto anche in un lavoro di Pappas e collaboratori. [Pappas et al 2000]



**Fig. 4.11:** Questo pannello rappresenta la caratterizzazione del profilo istologico dei gruppi di animali lesionati con 192-IgG-sap e/o anti-DBH-sap e/o 6-OHDA. (Scale Bar = 100  $\mu$ m) (Nel testo i dettagli)



**Fig. 4.12:** Confronto tra l'innervazione DBH-positiva nel DG dell'ippocampo di un animale di controllo (A), di un animale lesionato solo con anti-DBH-sap (B) e di uno che ha ricevuto la somministrazione di entrambe le immunotossine: 192-IgG-sap ed anti-DBH-sap (C). (DG=giro dentato) (Scale Bar = 100  $\mu$ m)

## 4.2 EFFETTI NEUROPATOLOGICI INDOTTI DA DEPLEZIONE COLINERGICA ED INFUSIONE IPPOCAMPALE DI BETA-AMILOIDE PRE-AGGREGATA NEL RATTO

### 4.2.1 Osservazioni generali

Gli animali intatti e trattati con veicolo (PBS1X) non hanno mostrato differenze sotto il profilo comportamentale e nemmeno in quello istologico, per questo motivo nelle analisi statistiche sono stati accorpati in un unico gruppo denominato "controlli" (CTRL). Anche nelle figure di questa tesi ci si riferirà ad essi come gruppo dei controlli (CTRL).

Tutti gli animali testati sono stati sottoposti a test motori e visuo-spaziali preliminari (quali il Cue-test), i quali hanno permesso di escludere problemi di tipo sensoriale-motorio e non hanno rilevato differenze significative per quanto riguarda velocità di nuoto (compresa in genere tra i 0,2 ed i 0,3 m/s); suggerendo che i trattamenti lesivi somministrati non producono altri effetti collaterali oltre a quelli cognitivi che ci si propone d'indagare.

### 4.2.2 Analisi funzionali

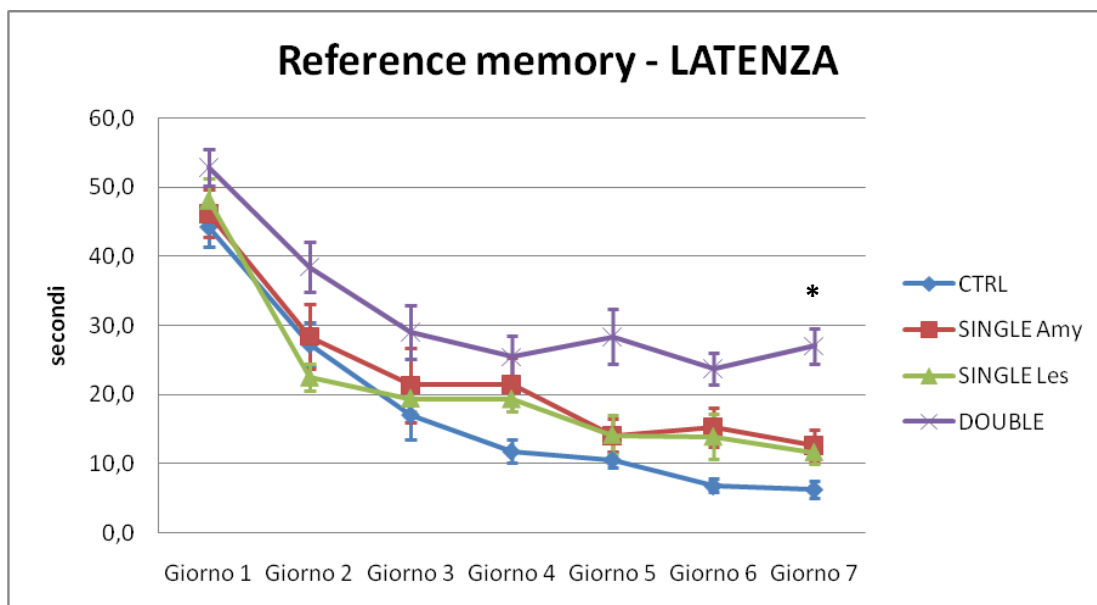
#### 4.2.2.1 REFERENCE MEMORY

Dall'analisi dei dati ottenuti tramite il MWM test si è visto che tutti gli animali riescono a migliorare la loro prestazione durante i 7 giorni di test, riducendo sia il tempo impiegato per trovare la piattaforma nascosta (Fig. 4.13), che la distanza percorsa per raggiungerla (Fig. 4.14).

Il gruppo degli animali che ha ricevuto sia la lesione al sistema colinergico che l'infusione di beta-amiloide pre-aggregata nell'ippocampo (DOUBLE) presenta però dei deficit significativamente ( $p < 0,05$ ) maggiori nella memoria di riferimento spaziale, sia per quanto riguarda la latenza che la distanza, rispetto agli altri tre gruppi. Infatti, anche durante l'ultimo giorno di test completa il compito con più difficoltà, impiegando in media 30 secondi contro

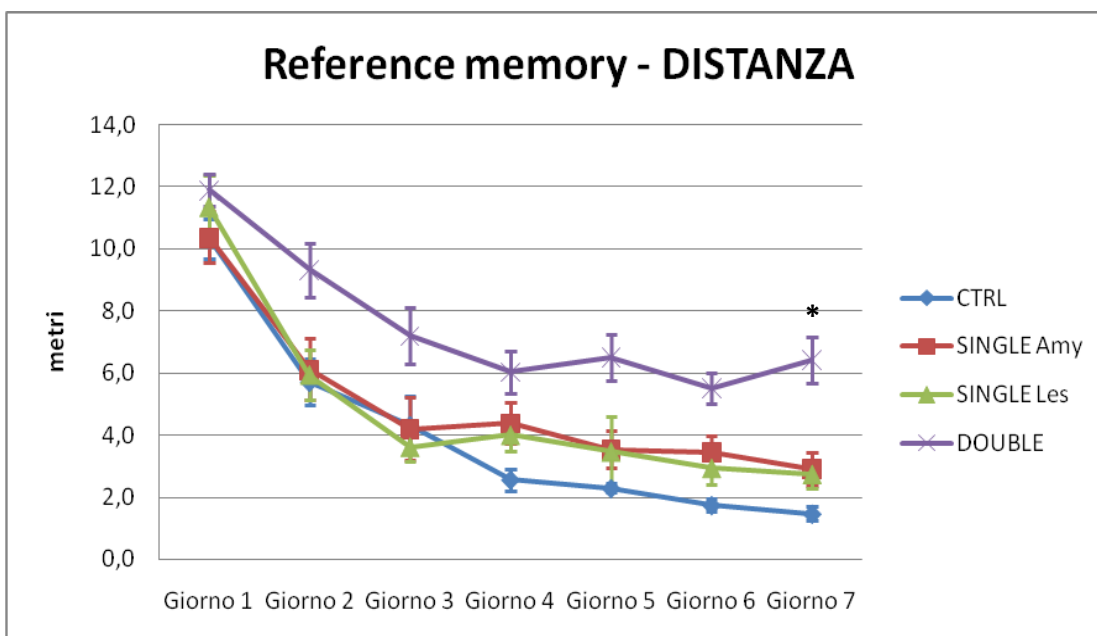


gli 8 (secondi) dei controlli (Fig. 4.13), e percorrendo in media 6 metri contro i 2 (metri) di questi ultimi prima di raggiungere il target (Fig. 4.14).



**Fig. 4.13:** Analisi funzionale della memoria di riferimento spaziale indagata tramite MWM test in animali lesionati al sistema colinergico del prosencefalo di base e/o infusi con beta-amiloide 25-35 pre-aggregata in ippocampo. In figura sono riportati i tracciati che rappresentano il tempo medio (calcolato in secondi) impiegato dagli animali per trovare la piattaforma durante i 7 giorni di test.

Come si può notare dal grafico gli animali appartenenti al gruppo dei DOUBLE apprendono più lentamente rispetto agli altri gruppi ed in particolare, durante l'ultimo giorno di test, raggiungono il target nel triplo del tempo impiegato dal gruppo dei controlli. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

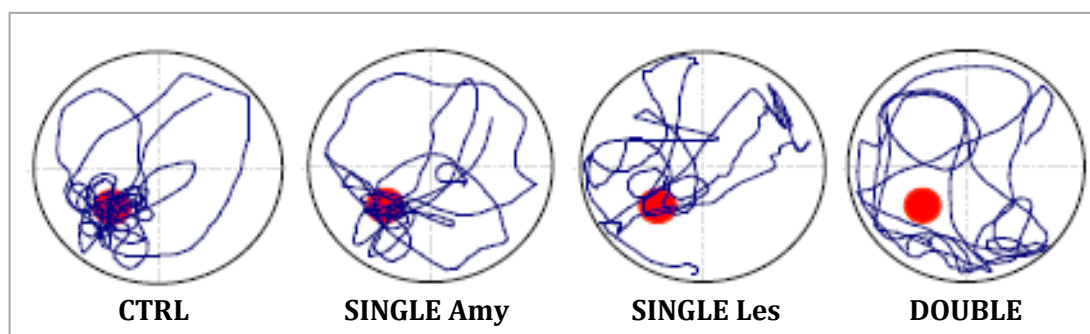


**Fig. 4.14:** Analisi funzionale della memoria di riferimento spaziale indagata tramite MWM test in animali lesionati al sistema colinergico del prosencefalo di base e/o infusi con beta-amiloide 25-35 pre-aggregata in ippocampo. In figura sono riportati i tracciati che rappresentano la distanza media (calcolata in metri) percorsa dagli animali per trovare la piattaforma durante i 7 giorni di test. Come mostra chiaramente il grafico il gruppo dei DOUBLE mostra dei deficit significativi nella reference memory in confronto agli altri gruppi. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

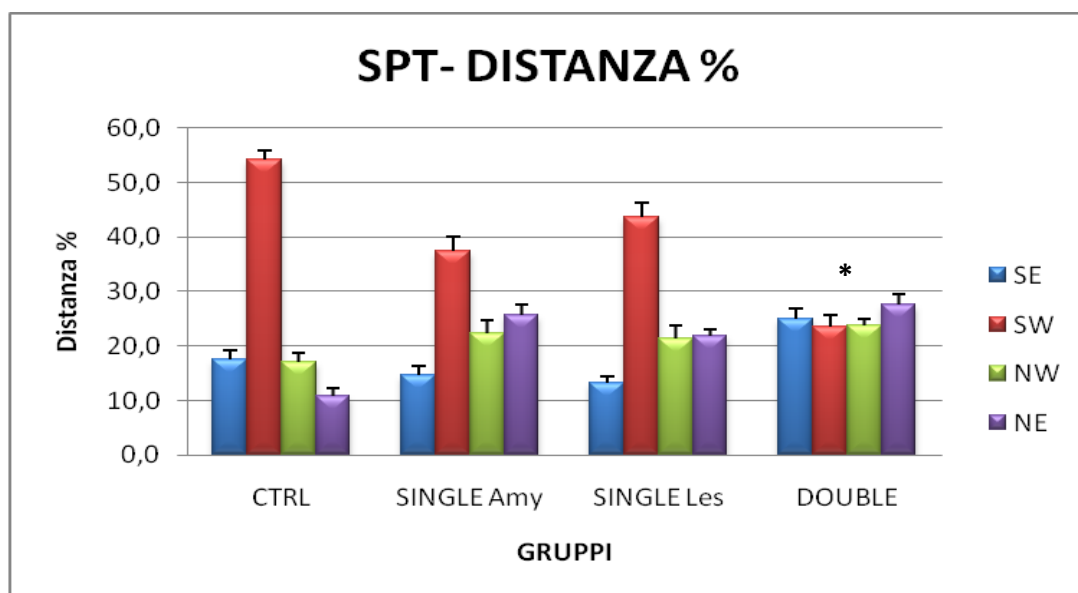
I gruppi degli animali che hanno ricevuto i trattamenti singoli (SINGLE Amy e SINGLE Les) invece non mostrano differenze significative in nessuno dei due parametri analizzati in questo test se rapportati ai controlli (CTRL).

#### 4.2.2.2 ACCURATEZZA DELL'APPRENDIMENTO

Alla fine dell'ultimo giorno di MWM test, la piattaforma è stata rimossa dalla vasca e ciascun animale è stato fatto nuotare per 1 minuto. Questa prova è definita *Spatial Probe Trial* (SPT) e serve per misurare l'accuratezza del processo di apprendimento avvenuto durante il MWM test, verificando l'abilità dell'animale di ritrovare il punto preciso dove la piattaforma era solitamente situata nei sette giorni precedenti. Come si vede dai tracciati di nuoto esemplificativi di ogni gruppo (Fig. 4.15), tutti gli animali si dirigono nel luogo dove erano abituati a trovare la piattaforma e concentrano il loro nuoto nel quadrante di SW (Fig. 4.16), collidendo in maniera maggiore con l'*annulus* che si trova all'interno di questa zona della vasca (Fig. 4.17); tranne quelli appartenenti al gruppo dei DOUBLE, che invece non mostrano una corretta strategia di ricerca spaziale (Fig. 4.15) e navigano indistintamente in tutti i quadranti della vasca (Fig. 4.16) senza preferire nessun *annulus* (Fig. 4.17), confermando in questo modo la presenza di una disfunzione a livello dell'apprendimento spaziale.

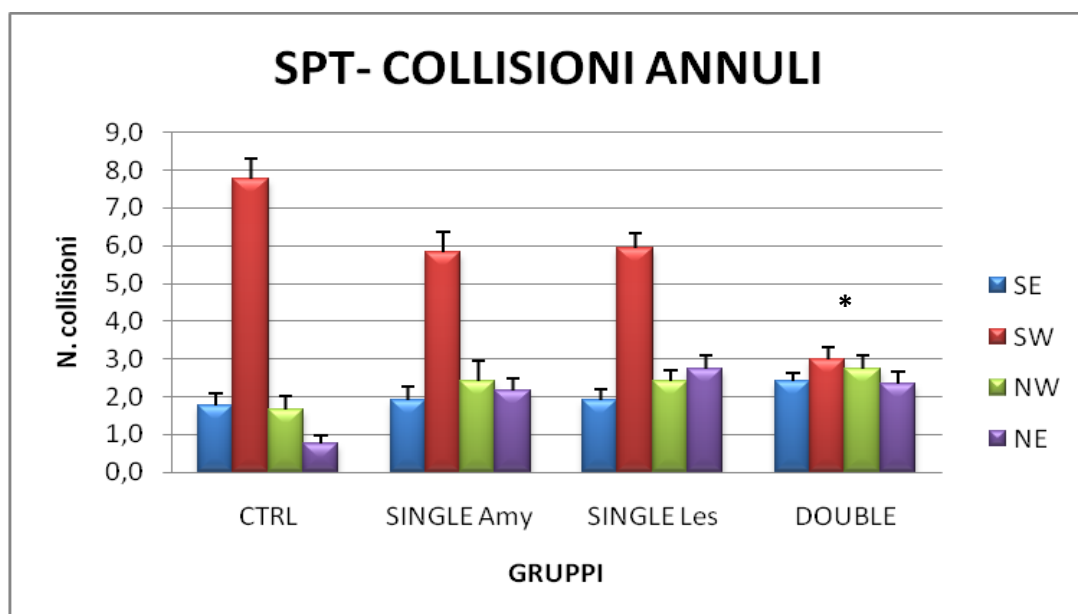


**Fig. 4.15:** Esempi di tracciati di nuoto (linee in blu scuro) registrati durante lo SPT da ogni gruppo. Tutti gli animali mostrano una corretta strategia di ricerca della piattaforma (cerchio rosso), tranne quelli che appartengono al gruppo dei DOUBLE, che invece sembrano nuotare a caso.



**Fig. 4.16:** Questi istogrammi rappresentano la distanza media, misurata in percentuale, percorsa dai ratti nei vari quadranti della vasca, in cui quello di SW corrisponde alla posizione originaria della piattaforma. Come si vede tutti i gruppi concentrano il loro nuoto in questo quadrante, tranne quelli appartenenti al gruppo dei DOUBLE che invece nuotano indistintamente in tutti e 4 i quadranti senza preferirne nessuno in particolare.

(\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

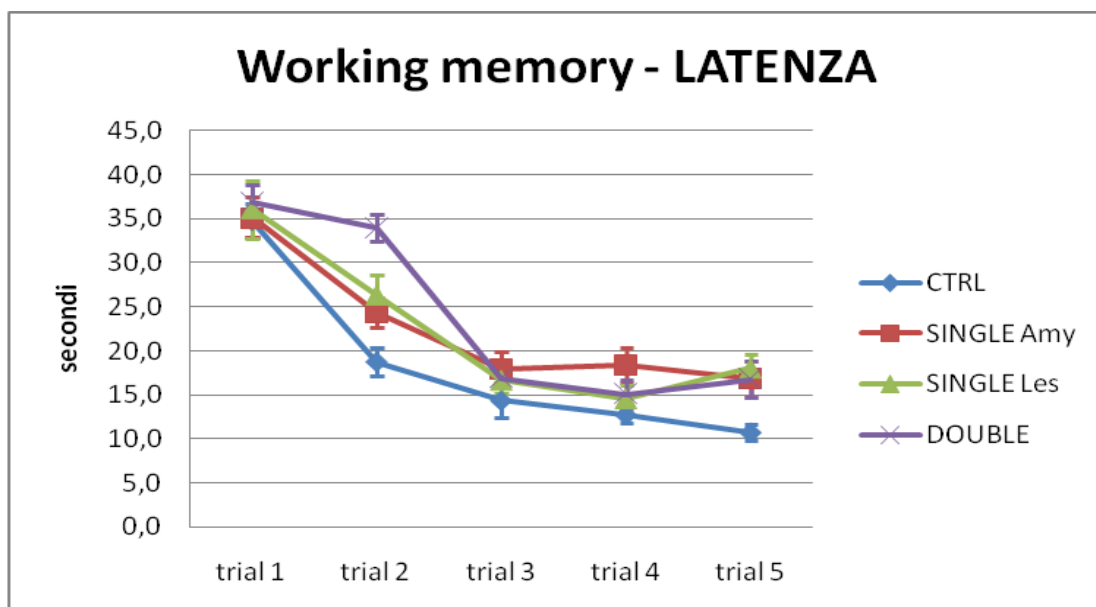


**Fig. 4.17:** Anche l'analisi delle collisioni con gli annuli dimostra che gli animali appartenenti al gruppo dei DOUBLE presentano dei deficit a livello dell'apprendimento spaziale, infatti, al contrario degli altri 3 gruppi, cercano la piattaforma in egual modo in tutti e 4 gli annuli invece di concentrarsi solo su quello di SW. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

#### 4.2.2.3 WORKING MEMORY

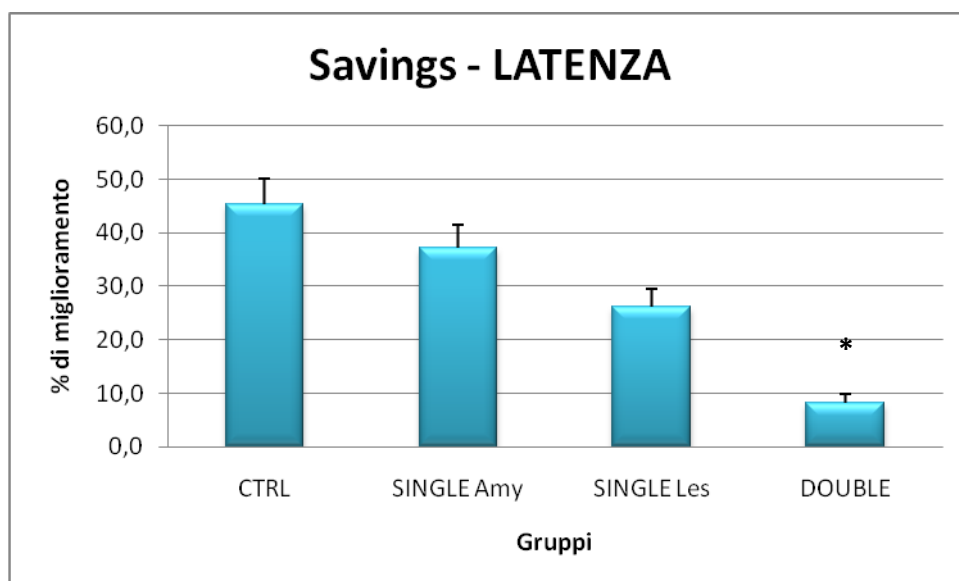
La capacità della memoria di lavoro degli animali viene verificata tramite il *Radial Arm Water Maze* (RAWM). In questo test la vasca è divisa in sei corridoi e la piattaforma viene posizionata in fondo ad uno di questi bracci, cambiando posizione quotidianamente. Quindi gli animali ogni giorno devono imparare entro i 5 trials a disposizione dove si trova la

piattaforma. In questo test vengono valutati il tempo impiegato a raggiungere il target (massimo un minuto) e gli errori effettuati (è considerato errore quando l'animale supera con il muso la metà di un braccio vuoto). Dall'analisi della latenza si evince che in tutti i gruppi c'è un progressivo miglioramento ad effettuare il compito durante i 5 trials giornalieri, passando da una performance media di 35 secondi durante la prima prova fino ad arrivare nell'ultima a raggiungere i 10 secondi per i controlli ed i 17 secondi per gli altri gruppi (Fig. 4.18). La differenza più significativa si registra invece nella percentuale di miglioramento tra il primo ed il secondo trial, evidenziata chiaramente dall'analisi dei *Savings* (Fig. 4.19), dove gli animali che hanno ricevuto i trattamenti singoli (SINGLE Amy e SINGLE Les) mostrano dei deficit di medio livello nel processo di apprendimento (riducendo la latenza rispettivamente del 35 e del 25% contro il 45% raggiunto dai controlli), mentre negli animali con entrambi i trattamenti (DOUBLE) si osservano delle disfunzioni maggiori nella *working memory*, infatti questi riescono a migliorare solo dell'8%.



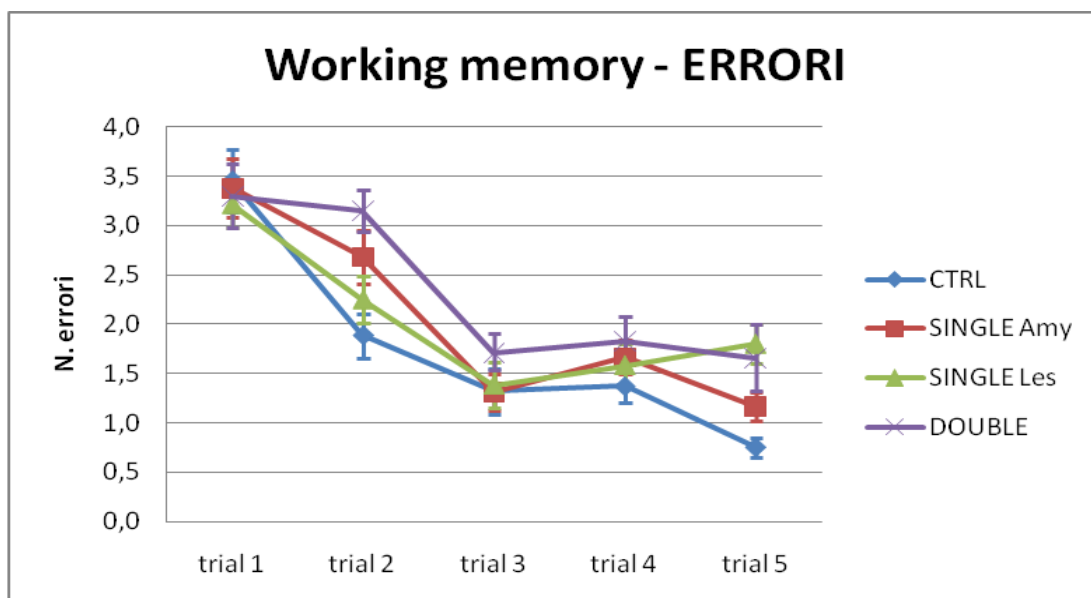
**Fig. 4.18:** Analisi funzionale della memoria di lavoro indagata tramite RAWM test in animali che hanno ricevuto la lesione al sistema colinergico e/o l'infusione di beta-amiloide pre-aggregata in ippocampo. In figura vengono riportati i tracciati che rappresentano il tempo medio (calcolato in secondi) impiegato dagli animali per trovare la piattaforma durante i 5 trials che vengono effettuati ogni giorno per 5 giorni. La differenza maggiore nel grado di apprendimento si registra tra il primo ed il secondo trial, dove gli animali del gruppo dei DOUBLE presentano dei gravi deficit di working memory, mentre quelli che hanno ricevuto i trattamenti singoli (SINGLE Amy e SINGLE Les) mostrano delle disfunzioni di livello medio rapportati alle performance dei controlli.



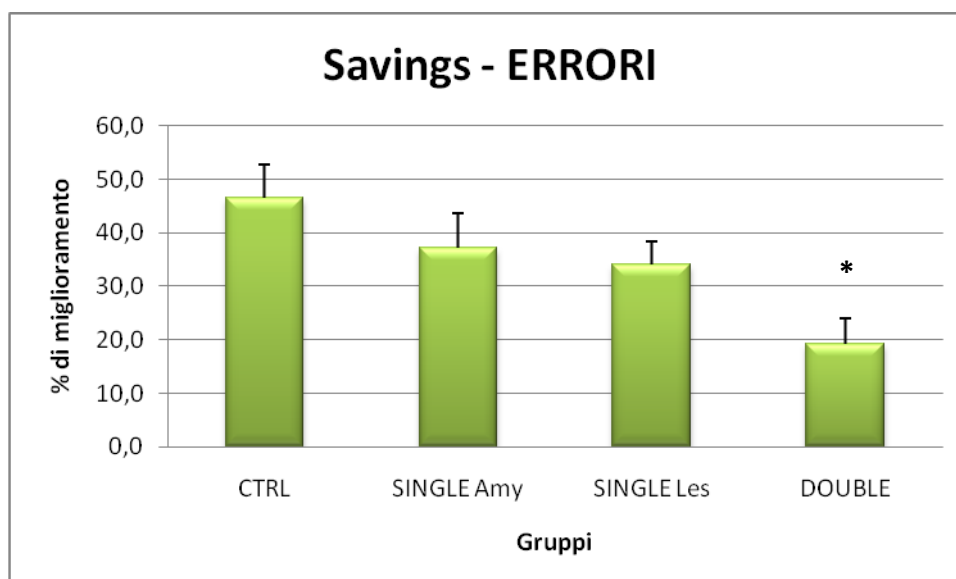


**Fig. 4.19:** Dall'analisi dei Savings per la latenza risulta chiaro che il gruppo dei DOUBLE riesce a migliorare in maniera effimera tra il primo ed il secondo trial rispetto agli altri tre gruppi, in particolare in confronto ai controlli. Inoltre è importante notare che la lesione al solo sistema colinergico provoca dei deficit maggiori nella working memory di quanto invece faccia la sola infusione di beta-amiloide in forma di oligomeri. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

Dall'analisi degli errori si ottiene un quadro molto simile a quello visto per la latenza, in cui tutti gli animali migliorano durante i 5 trials del RAWM test (Fig. 4.20), ma mentre i controlli tra il primo ed il secondo trial riducono significativamente il numero degli errori (dimezzandoli), gli animali con le singole lesioni (SINGLE Les e SINGLE Amy) riescono a migliorare di meno (40%) e i DOUBLE in maniera ancora minore (20%). (Fig. 4.21)



**Fig. 4.20:** Analisi funzionale della memoria di lavoro indagata tramite RAWM test in animali che hanno ricevuto la lesione al sistema colinergico e/o l'infusione di beta-amiloide pre-aggregata in ippocampo. In figura vengono riportati i traccati che rappresentano la media degli errori effettuati dai diversi gruppi durante i 5 trials giornalieri del test. La differenza maggiore di performance si registra tra il primo ed il secondo trial, dove gli animali con doppia lesione (DOUBLE) sbagliano significativamente di più rispetto ai controlli. I gruppi SINGLE Amy e SINGLE Les si piazzano invece in una posizione intermedia.

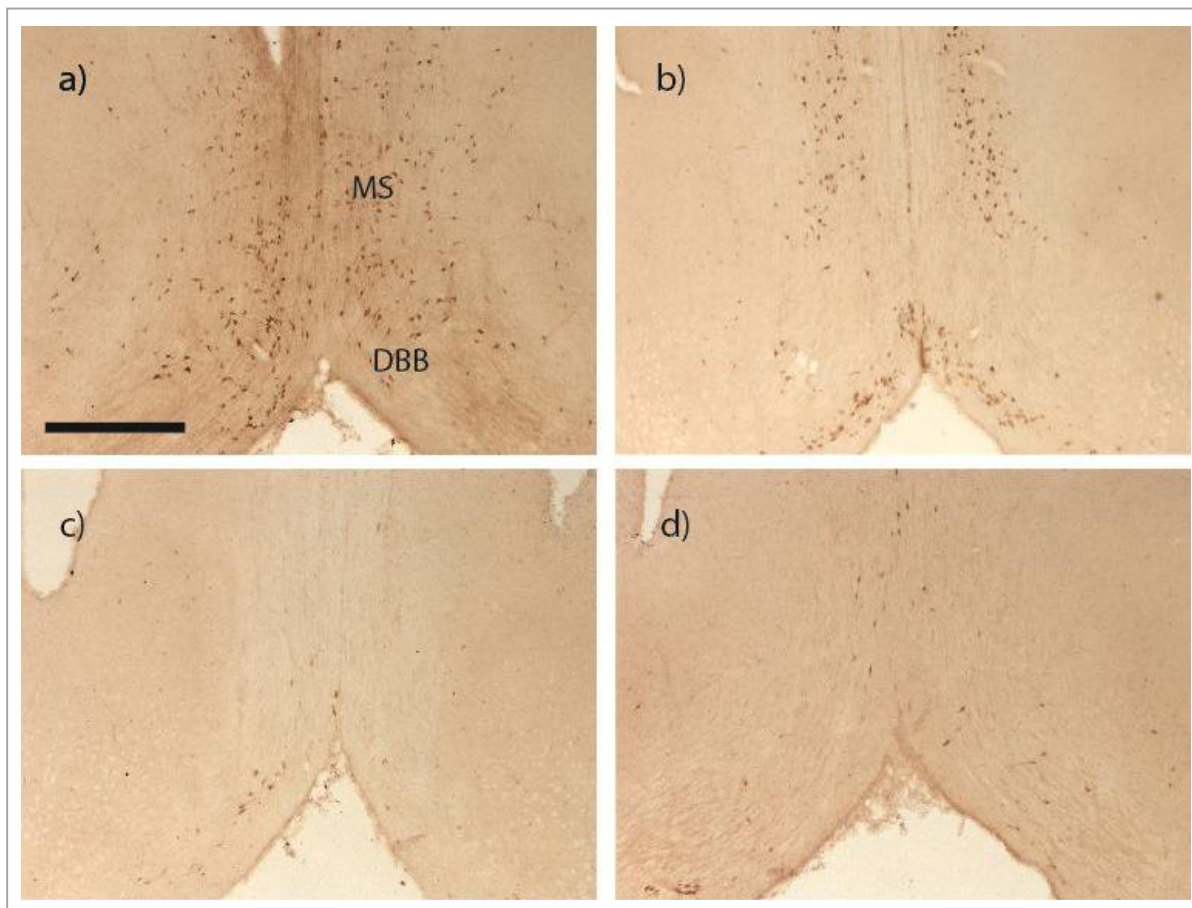


**Fig. 4.21:** Dall'analisi dei Savings per gli errori risulta chiaro che il gruppo dei DOUBLE riesce a migliorare in maniera effimera tra il primo ed il secondo trial rispetto agli altri tre gruppi, in particolare in confronto ai controlli, presentando dei chiari deficit nella memoria di lavoro. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

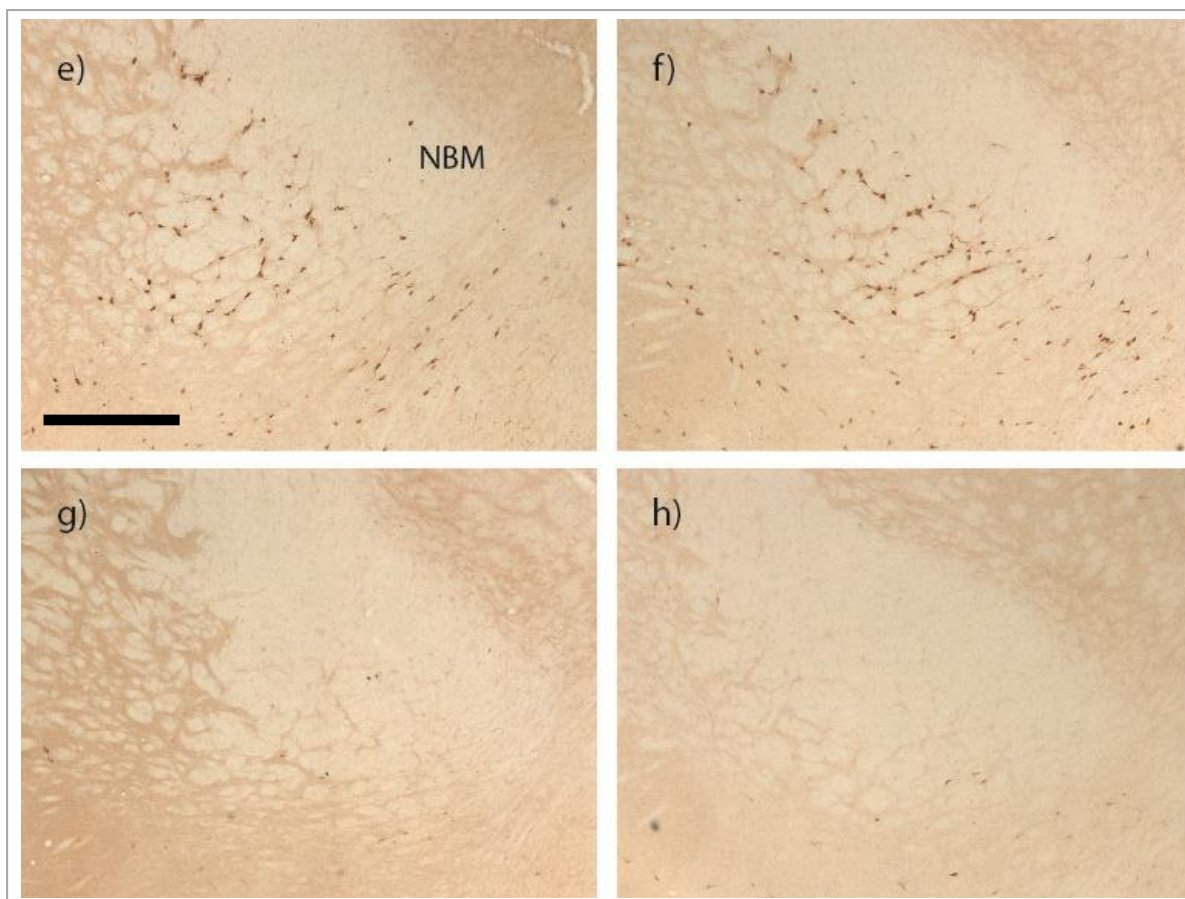
### 4.2.3 Analisi istologiche

#### 4.2.3.1 IL SISTEMA COLINERGICO

In Fig. 4.22 viene mostrato l'effetto della lesione con 192-IgG-sap e/o dell'infusione ippocampale di beta-amiloide 25-35 pre-aggregata, nei neuroni colinergici del MS e della DBB, rilevati immunostochimicamente tramite anticorpo anti-ChAT in sezioni cerebrali coronali processate in *free-floating*. In queste zone, a due mesi dai trattamenti, si osserva una massiva perdita di neuroni ChAT-positivi negli animali che hanno ricevuto l'iniezione dell'immunotossina 192-IgG-sap nei nuclei colinergici del *prosencefalo di base* (BF) sia quando questa è stata accoppiata all'infusione degli oligomeri di beta-amiloide nell'ippocampo (DOUBLE) che sia quando è stata somministrata singolarmente (SINGLE Les). La percentuale di perdita neuronale in questi due gruppi è simile. Invece, non ci sono differenze morfologiche e quantitative rilevanti in questi neuroni se si comparano le sezioni del gruppo trattato con la sola beta-amiloide pre-aggregata (SINGLE Amy) con quelle appartenenti al gruppo dei controlli (CTRL). Questo fa assumere che il trattamento con beta-amiloide 25-35 pre-aggregata, iniettata in ippocampo, non provoca effetti sui neuroni colinergici del BF. Identici risultati sono stati trovati analizzando i neuroni colinergici ChAT-positivi contenuti nel NBM, come viene mostrato in Fig. 4.23.

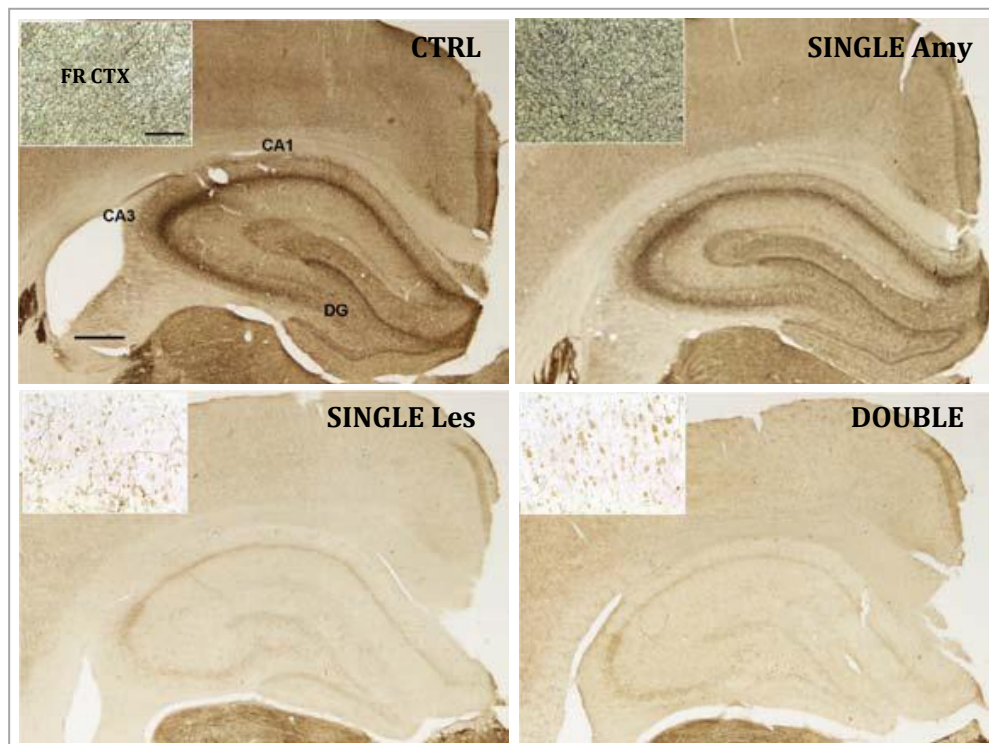


**Fig. 4.22:** Particolari di sezioni coronali contenenti il setto mediale (MS) e la banda diagonale di Broca (DBB) in cui sono stati colorati immunostochimicamente i corpi cellulari dei neuroni colinergici che contengono l'enzima colina acetiltransferasi (ChAT).  
**a)** CTRL; **b)** SINGLE Amy; **c)** SINGLE Les; **d)** DOUBLE. (Scale Bar = 500  $\mu$ m)



**Fig. 4.23:** Particolari di sezioni coronali contenenti il nucleo basale magnocellulare (NBM) in cui sono stati colorati immunostochimicamente i corpi cellulari dei neuroni colinergici che contengono l'enzima colina acetiltransferasi (ChAT). Si evidenzia la perdita massiva di neuroni ChAT-positivi di questo nucleo solo nelle due foto in basso (g ed h) che corrispondono a degli animali trattati con l'immunotossina 192-IgG-sap in o combinazione (h) o meno (g) con l'infusione ippocampale di beta-amiloide 25-35 pre-aggregata.  
**e) CTRL; f) SINGLE Amy; g) SINGLE Les; h) DOUBLE.** (Scale Bar = 500  $\mu$ m)

L'effetto dei trattamenti sull'innervazione colinergica che dai nuclei del *prosencefalo di base* raggiunge l'*ippocampo* e la *neocorteccia* è stata analizzata tramite una colorazione istochimica che evidenzia la presenza dell'enzima acetilcolina esterasi (AChE) su queste fibre. Come si vede dal pannello in Fig. 4.24, gli animali appartenenti al gruppo dei controlli (CTRL) e quelli trattati singolarmente con beta-amiloide 25-35 pre-aggregata (SINGLE Amy) mostrano un'alta concentrazione di queste fibre AChE-positivo sia in ippocampo che in corteccia frontale e non differiscono tra loro, mentre si osserva una massiccia denervazione, in entrambe le zone analizzate, negli animali che hanno ricevuto l'iniezione dell'immunotossina 192-IgG-sap nei nuclei colinergici del BF con (DOUBLE) o senza (SINGLE Les) il concomitante inoculo di beta-amiloide. Questi risultati sono in linea con quanto trovato dall'analisi istochimica dei corpi cellulari ChAT-positivi da cui queste fibre dipartono, e conferma il fatto che il trattamento con la beta-amiloide 25-35 pre-aggregata non influenza la degenerazione di questi neuroni colinergici e nemmeno quella dei loro processi.

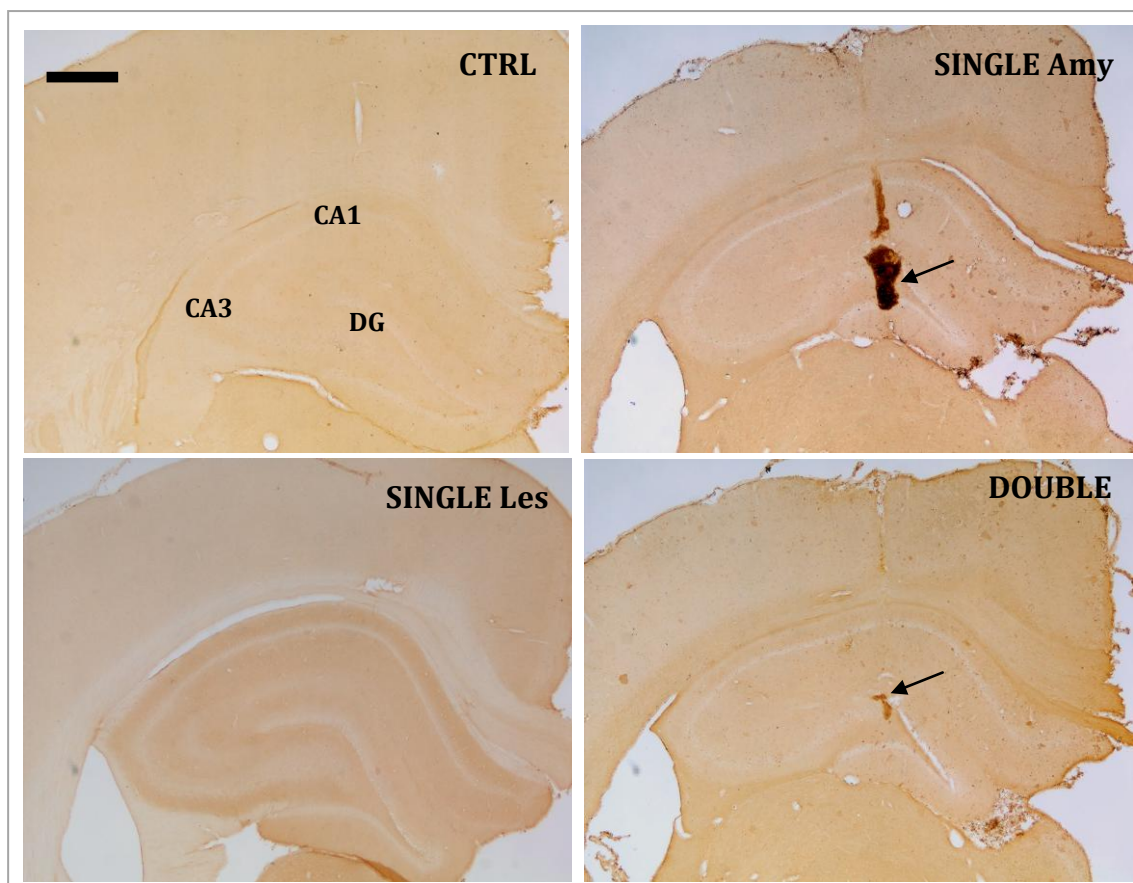


**Fig:4.24:** Sezioni rappresentative di tessuti cerebrali processati tramite colorazione istochimica per la rilevazione dell'enzima AChE. Nella parte superiore del pannello sono mostrati gli ippocampi e le cortece frontali (nei particolari) di animali appartenenti rispettivamente al gruppo dei controlli (CTRL) ed al gruppo dei trattati con sola infusione di beta-amiloide (SINGLE Amy); si noti come questi due gruppi non mostrino perdita d'innervazione colinergica in tali aree. Nella parte inferiore si trovano invece i particolari delle cortece frontali e gli ippocampi di animali lesionati ai nuclei colinergici del BF tramite infusione locale dell'immunotossina 192-IgG-sap, sia in modo singolo (SINGLE Les) che combinato con l'inoculo di beta-amiloide pre-aggregata (DOUBLE). In entrambi questi gruppi si osserva la degenerazione quasi totale dell'innervazione colinergica. (CA=corno d'Ammon dell'ippocampo; DG=giro dentato; FR CTX=corteccia frontale) (Scale Bar = 500 um; e 50 um nell'inserito)

#### 4.2.3.2 BETA-AMILOIDE 25-35

Tramite una colorazione immunoistochimica diretta contro la beta-amiloide 25-35 si è andati a visualizzare la sua localizzazione a due mesi dalla sua iniezione in ippocampo. Come si vede in Fig. 4.25 c'è un evidente accumulo di beta-amiloide 25-35 nel giro dentato degli animali appartenenti ai gruppi SINGLE Amy e DOUBLE (che tende a rimanere confinato in questa zona), mentre non è presente immunoreattività negli ippocampi dei ratti dei gruppi di controllo (CTRL) e lesionati solo con la 192-IgG-sap nei nuclei del BF (SINGLE Les).





**Fig.4.25:** Sezioni coronali rappresentative contenenti l'ippocampo e processate per la rilevazione immunoistochimica del frammento 25-35 della beta-amiloide. Come si vede nelle foto dei gruppi SINGLE AMY e DOUBLE gli aggregati proteici immunoreattivi (indicati dalle frecce) tendono a rimanere localizzati nella zona dove erano stati iniettati 2 mesi prima, e non diffondono in altre regioni. Invece, questi aggregati proteici non sono presenti nel gruppo dei controlli (CTRL), e nemmeno in quello degli animali lesionati con la sola 192-IgG-sap (SINGLE Les). (CA=corno d'Ammon dell'ippocampo; DG=giro dentato) (Scale Bar = 500 um)

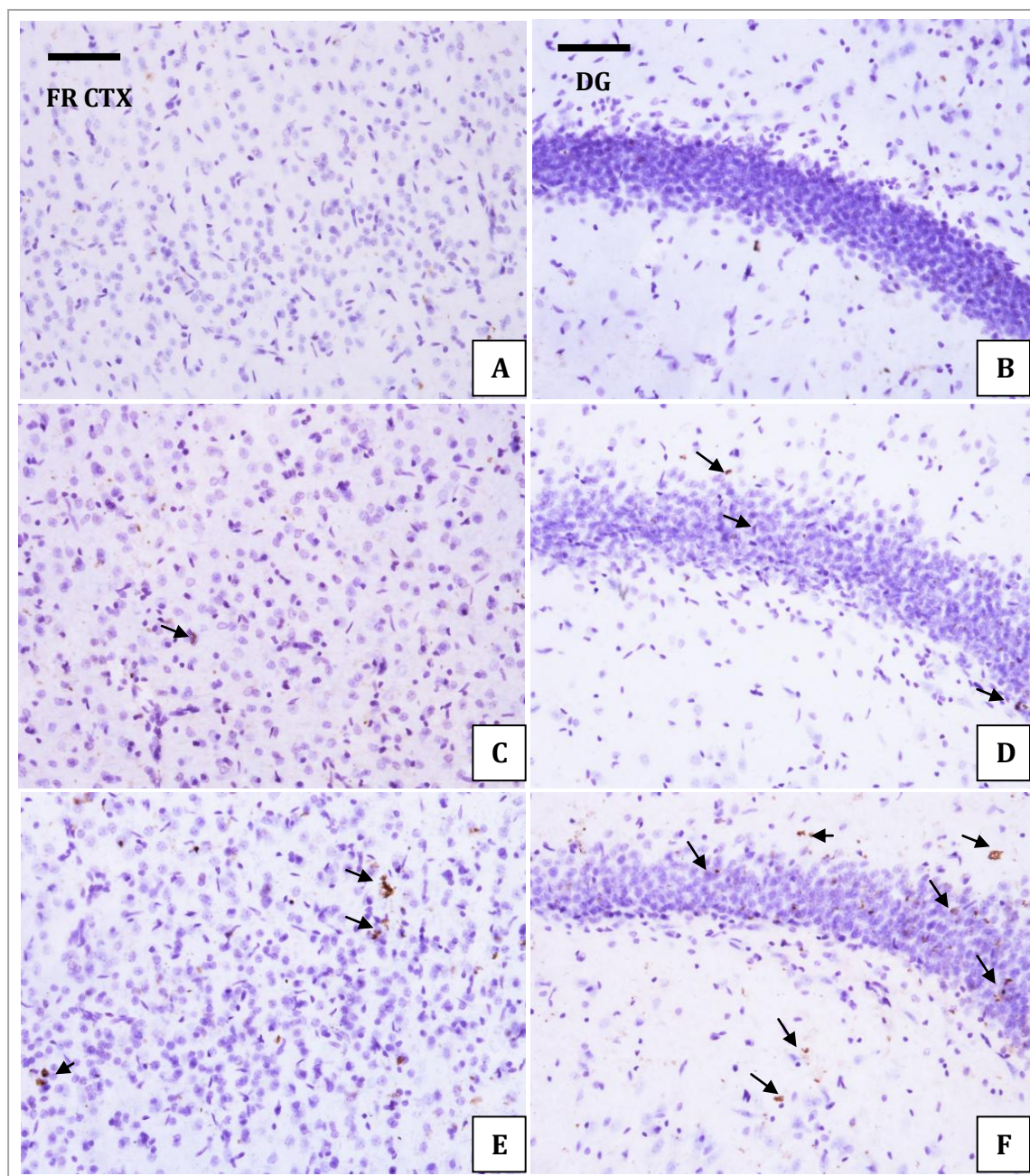
#### 4.2.3.3 TAU-FOSFORILATA

Per analizzare in che modo e se la lesione colinergica e l'aggregazione della beta-amiloide influenzino la fosforilazione della proteina Tau alcune sezioni derivanti dai gruppi CTRL, SINGLE LES e DOUBLE sono state processate immunoistochimicamente con un anticorpo primario diretto contro la Tau fosforilata nel residuo di treonina (Thr) 181 (anti-TAU-P181Thr), e successivamente colorate con il Cresil Violetto per vedere in maggior dettaglio la localizzazione della Tau-fosforilata così rilevata.

Le sezioni derivanti dagli animali con singolo trattamento di beta-amiloide non sono state processate per problemi tecnici.

Dall'analisi microscopica delle sezioni è risultato esserci l'accumulo di Tau-fosforilata nella neocorteccia e nell'ippocampo (in particolare nel giro dentato) degli animali appartenenti al gruppo dei DOUBLE e dei SINGLE Les, mentre l'immunoreattività rilevata in queste zone nel gruppo dei controlli (CTRL) era veramente scarsa. (Fig. 4.26)

I depositi di Tau-fosforilata che sono stati osservati erano localizzati prevalentemente a livello peri-nucleare.

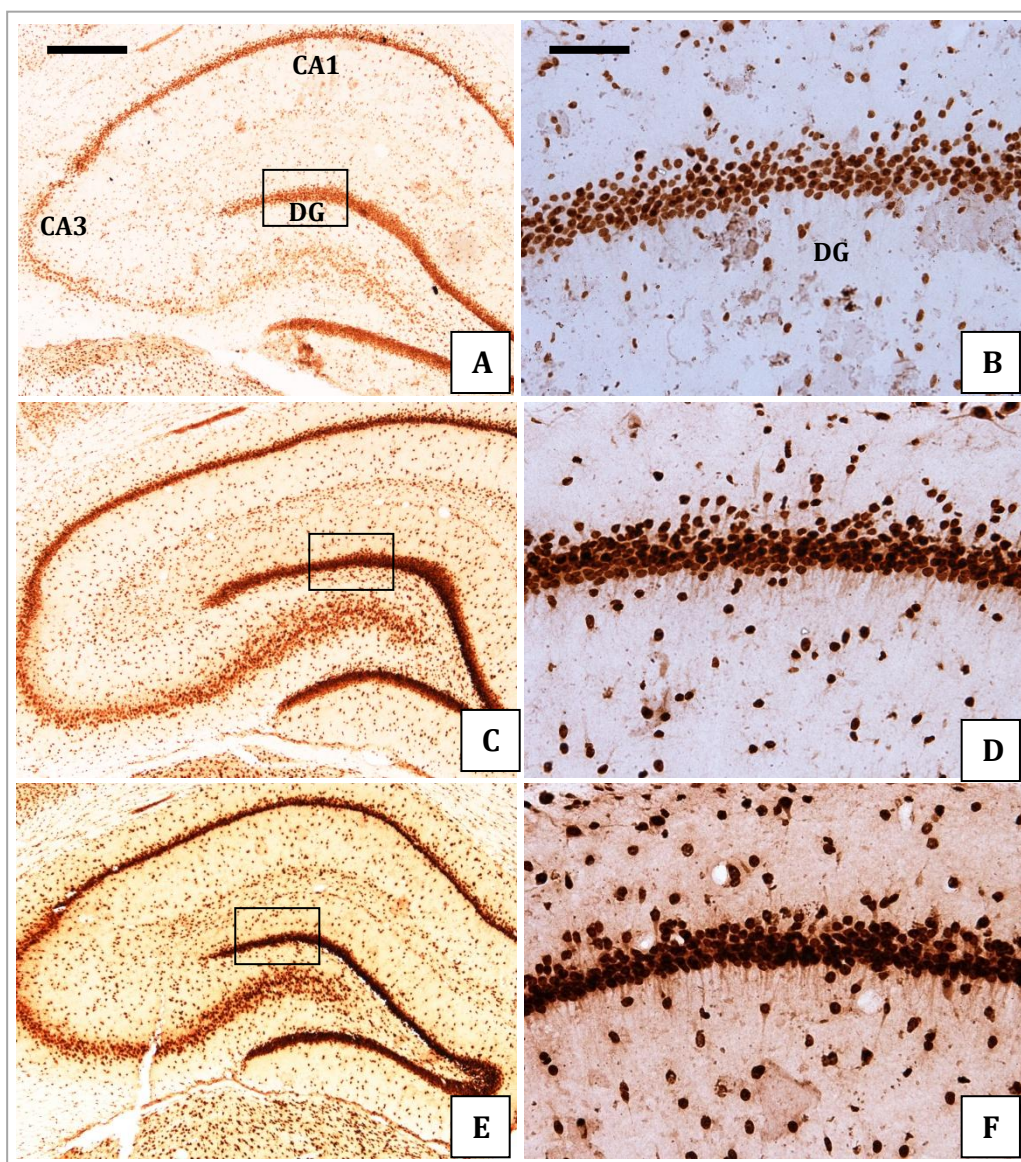


**Fig.4.26:** Nella colonna di sinistra sono riportate delle sezioni rappresentative di corteccia frontale (FR CTX) ed in quella di destra del giro dentato dell'ippocampo (DG), fotografate ad alto ingrandimento, processate tramite immunisto chimica per la rilevazione della TAU-fosforilata in posizione 181Thr e successivamente trattate con colorazione di Nissl per evidenziare la localizzazione cellulare dei depositi immunoreattivi. Gli accumuli di TAU-fosforilata (indicati in figura dalle frecce), si localizzano prevalentemente nel soma dei neuroni e si osservano sia nella corteccia che nell'ippocampo degli animali appartenenti ai gruppi SINGLE Les e DOUBLE, mentre sono molto scarsi nei tessuti dei controlli (CTRL). (A-B=CTRL; C-D=SINGLE Les; E-F=DOUBLE) (Scale Bar = 50 um)



#### 4.2.3.4 TDP-43

La colorazione immunohistochimica specifica per il rilevamento della proteina TDP-43 nei tessuti ippocampali e corticali degli animali analizzati, ha evidenziato una marcata presenza di immunoreattività in tutti i gruppi. E' stato però osservato che, a differenza del gruppo dei controlli (CTRL) in cui TDP-43 è concentrata prevalentemente nel nucleo, nei gruppi SINGLE Les e DOUBLE essa si localizza anche a livello citoplasmatico. Inoltre in questi due gruppi la colorazione a livello nucleare appare più intensa rispetto ai controlli, facendo supporre un aumento del suo livello anche in questo compartimento cellulare. (Fig. 4.27)  
Le analisi sul gruppo dei SINGLE Amy non state effettuate per problemi tecnici.



**Fig.4.27:** Nella colonna di sinistra sono riportate delle sezioni rappresentative di animali di controllo (A), SINGLE Les (C) e DOUBLE (E), contenenti l'ippocampo, che sono state processate tramite procedura immunohistochimica per rilevare la localizzazione della proteina TDP-43. Nella colonna di destra sono mostrate a più alto ingrandimento le porzioni di DG (riquadrate) degli stessi animali. Come si vede nei particolari la proteina TDP-43 nei CTRL (B) si localizza a livello del nucleo, mentre nei gruppi dei SINGLE Les (D) e dei DOPPI (F) è presente anche nel citoplasma dei neuroni, facendo supporre ad una sua disfunzione. (A-B=CTRL; C-D=SINGLE Les; E-F=DOUBLE) (Scale Bar = 250 um in A, C, E e 50 um in B, D, F)



#### **4.2.4 Analisi del contenuto proteico dell'ippocampo**

Tramite analisi densitometrica delle bande immunoreattive per APP, TAU totale (TAU TOT), TAU-fosforilata (TAU-P181Thr) e TDP-43 ottenute tramite Western Blot è stato possibile avere un'idea dell'ammontare di queste proteine nel tessuto ippocampale degli animali lesionati al solo sistema colinergico, o trattati anche con il peptide di beta-amiloide 25-35 pre-aggregato in confronto ad animali di controllo.

Per motivi tecnici non è stato possibile analizzare per TAU TOT, TAU-P181Thr e TDP-43 il contenuto proteico ippocampale degli animali inoculati con la sola beta-amiloide, nei quali comunque non ci si aspettava di trovare grandi differenze rispetto ai controlli; infatti da studi preliminari (non riportati) si è visto che l'espressione degli mRNA che codificano per queste proteine, indagata tramite Real-Time PCR, in questo gruppo non differisce dai livelli degli animali di controllo.

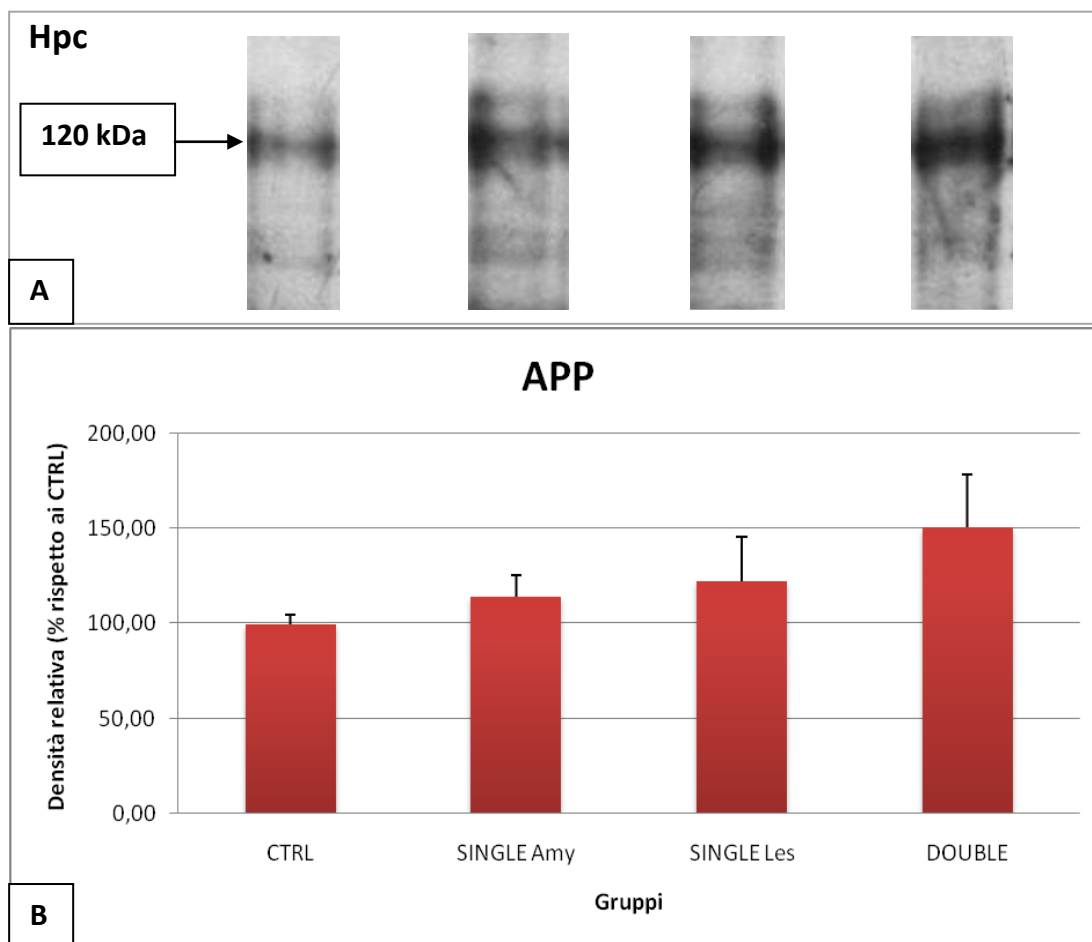
I valori ottenuti dall'analisi delle bande delle varie proteine indagate tramite Western Blot sono stati normalizzati basandosi su quelli ricavati dalla densità delle bande immunoreattive per la beta-tubulina (una proteina house-keeping usata come controllo interno) espressa negli stessi tessuti.

##### **4.2.4.1 APP**

A partire da omogenati di tessuto ippocampale appartenente a tutti gli animali dei gruppi sperimentati è stata effettuata un'analisi tramite Western Blot in modo da poter valutare gli effetti dei trattamenti utilizzati sui livelli relativi della proteina precursore dell'amiloide (APP). Questa procedura ha permesso di visualizzare delle bande immunoreattive per APP, che nel ratto hanno un peso molecolare di 120 kDa. (Fig. 4.28.A)

In figura 4.28.B viene invece riportato il risultato dell'analisi densitometrica di queste bande, che permette di farci un'idea sull'ammontare proteico di APP nell'ippocampo di animali singoli lesionati con 192-IgG-sap (SINGLE Les), di quelli a cui è stata iniettata solamente della beta-amiloide pre-aggregata in ippocampo (SINGLE Amy) e di quelli che hanno ricevuto entrambi i trattamenti (DOUBLE). I valori di densità ottenuti sono stati rapportati a quelli ricavati da animali di controllo e normalizzati rispetto al 100% di questi.

Come si vede nel grafico (4.28.B) il contenuto proteico di APP nell'ippocampo, rispetto ai controlli (CTRL), risulta maggiore del 50% nel gruppo dei DOUBLE, mentre quello in animali lesionati al solo sistema colinergico (SINGLE Les) o trattati solo con la beta-amiloide (SINGLE Amy) supera in modo moderato il valore di base, rispettivamente del 20% e del 10%. Nonostante si osservi una tendenza crescente di accumulo di questa proteina nell'ippocampo di animali che hanno ricevuto entrambi i trattamenti, questa differenza non risulta però significativa ( $p > 0,05\%$ ) rispetto ai valori di controllo.

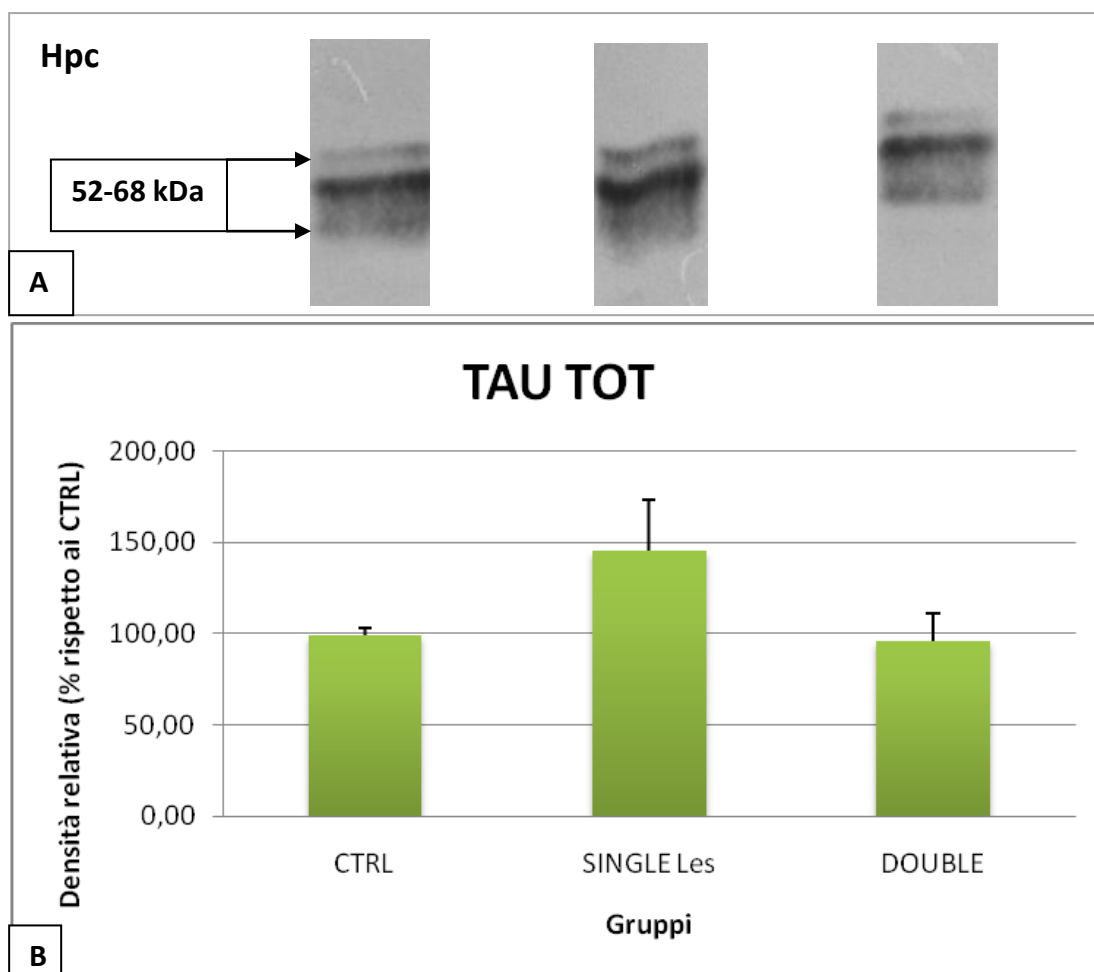


**Fig. 4.28: A)** Esempi di bande immunoreattive per APP ottenute tramite analisi con Western Blot. **B)** Grafico della densità relativa, espressa in % e normalizzata sui controlli (CTRL), del contenuto proteico di APP nell'ippocampo (Hpc) di animali lesionati al sistema colinergico (SINGLE Les) e/o trattati con beta-amiloide 25-35 pre-aggregata (DOUBLE e SINGLE Amy). Si evidenzia una tendenza di questa proteina ad aumentare in animali che hanno ricevuto entrambi i trattamenti, tuttavia la differenza con i controlli non è significativa ( $p > 0,05\%$ ).

#### 4.2.4.2 TAU TOTALE

A partire da omogenati di tessuto ippocampale appartenente agli animali dei gruppi CTRL, SINGLE Les e DOUBLE è stata effettuata un'analisi tramite Western Blot in modo da poter valutare gli effetti dei trattamenti utilizzati sui livelli relativi della proteina TAU totale. Come si vede in Fig. 4.29.A, questa proteina nel ratto è costituita da 3 diverse isoforme, che presentano un peso molecolare compreso tra i 52 ed i 68 kDa.

In Fig. 4.29.B viene mostrato quanto trovato dall'analisi densitometrica delle bande immunoreattive per TAU totale (TAU TOT). Gli animali trattati sia con 192-IgG-sap che con beta-amiloide pre-aggregata (DOUBLE) non differiscono dai controlli, mentre gli animali lesionati al sistema colinergico senza infusione di beta-amiloide pre-aggregata (SINGLE Les) mostrano un aumento relativo di questa proteina nell'ippocampo quasi del 50% quando vengono confrontati con i valori ottenuti dagli animali intatti (CTRL), tuttavia la differenza non è significativa ( $p > 0,05$ ).



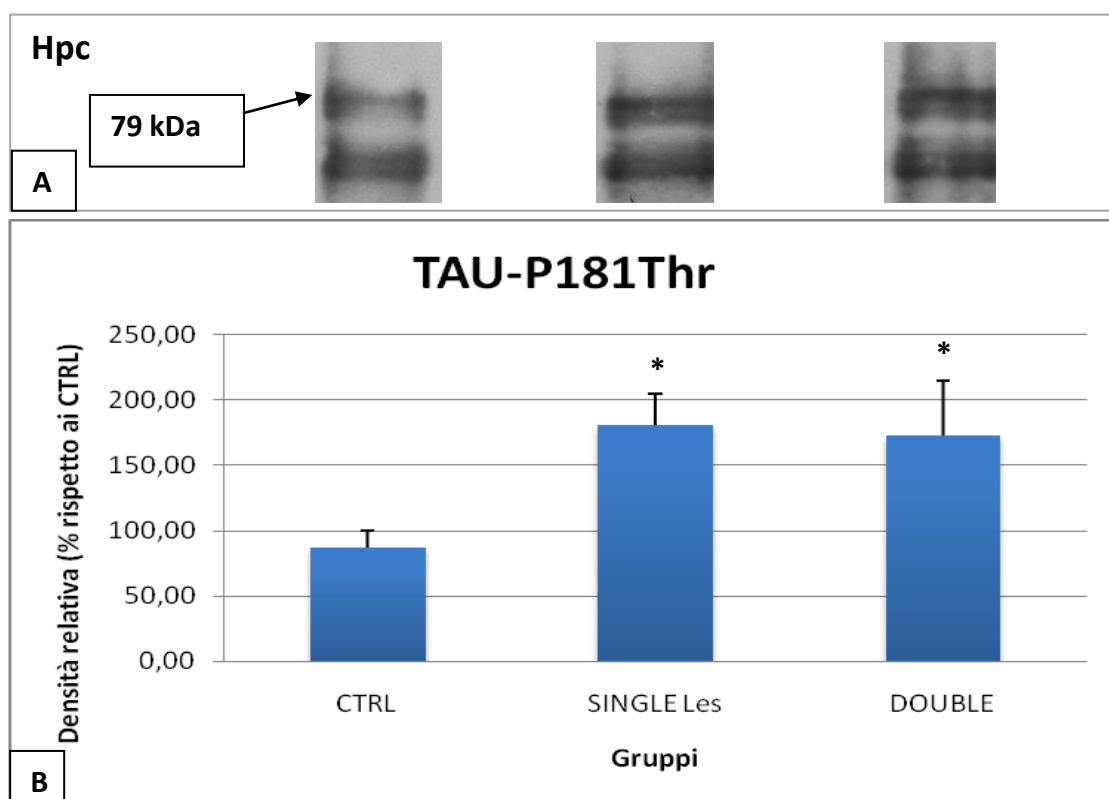
**Fig. 4.29: A)** Esempi di bande immunoreattive per TAU ottenute tramite analisi con Western Blot. **B)** Istogramma che rappresenta la densità relativa espressa in % del contenuto proteico di TAU totale nell'ippocampo di animali lesionati al sistema colinergico (SINGLE Les) ed a cui è stata somministrata anche della beta-amiloide pre-aggregata (DOUBLE), confrontati con i valori ottenuti da animali normali (CTRL). Non si evidenziano particolari differenze tra i gruppi, a parte un aumento (non significativo,  $p > 0,05\%$ ) della proteina in questione nei tessuti provenienti da animali SINGLE Les.

#### 4.2.4.3 TAU-FOSFORILATA

L'ippocampo di animali appartenenti ai gruppi CTRL, SINGLE Les e DOUBLE è stato omogenizzato ed analizzato tramite Western Blot per valutare gli effetti dei trattamenti utilizzati sui livelli relativi di fosforilazione della proteina TAU, in particolare è stato analizzato il grado di fosforilazione sulla treonina in posizione 181 di questa proteina. Utilizzando un anticorpo primario anti-TAU-P181Thr sono state quindi visualizzate delle bande di altezza pari a 79 kDa. (Fig. 4.30.A) Queste sono state poi analizzate tramite densitometria relativa ed il risultato è mostrato in Fig. 4.30.B. I livelli relativi dell'ammontare del contenuto proteico della proteina TAU-fosforilata (TAU-P181Thr) negli ippocampi di animali che hanno ricevuto la lesione al sistema colinergico (SINGLE Les) o anche l'infusione di beta-amiloide pre-aggregata (DOUBLE) sono stati confrontati e normalizzati con i valori ottenuti da animali di controllo. Come si vede dall'istogramma c'è un

aumento significativo ( $p < 0,05\%$ ) dell'80-90% dei livelli relativi di questa forma fosforilata della proteina TAU in entrambi i gruppi di lesionati (SINGLE Les e DOUBLE), che non differiscono tra loro, rispetto a quanto invece trovato negli animali intatti (CTRL).

Quanto trovato è in linea con i risultati ottenuti dall'analisi immunostochimica per TAU-fosforilata effettuata nelle sezioni ippocampali di questi animali.



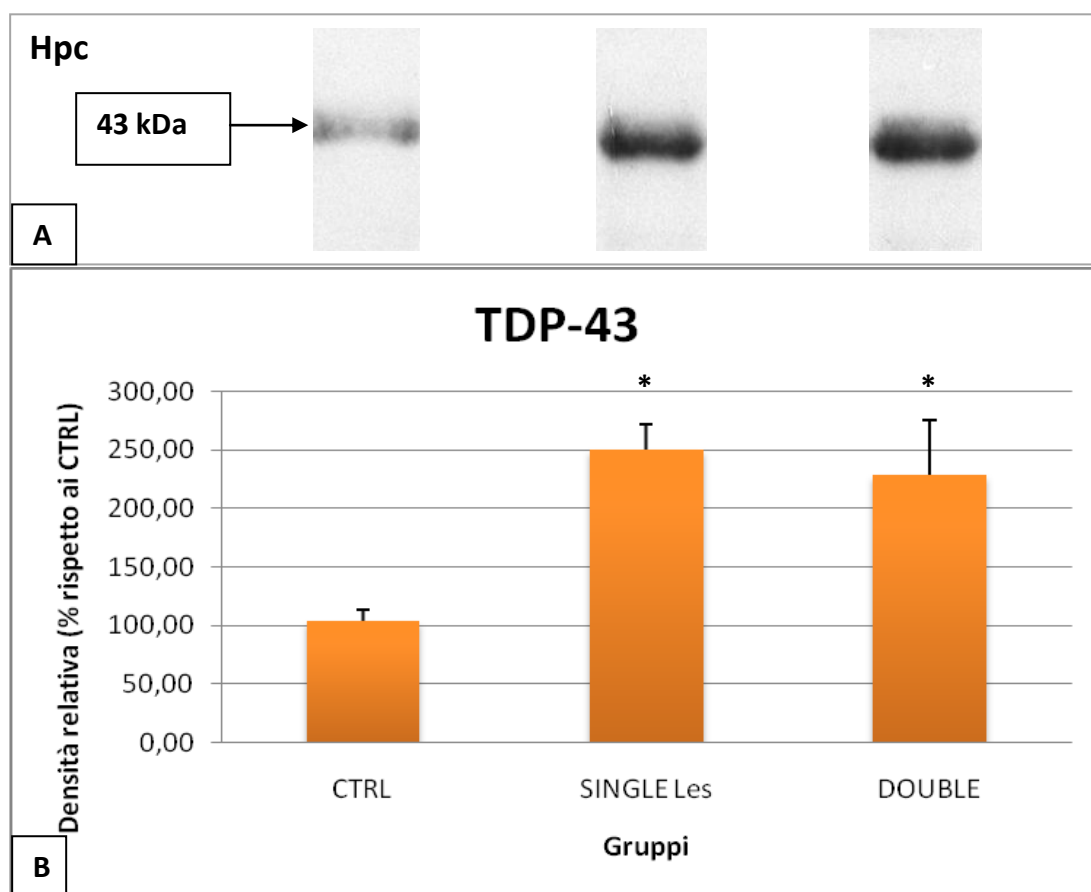
**Fig. 4.30: A)** Esempi di bande immunoreattive per la forma di TAU fosforilata sulla treonina 181 (TAU-P181Thr) ottenute tramite analisi con Western Blot. Per la quantificazione è stata analizzata la banda corrispondente ad un peso molecolare di 79 kDa. **B)** Grafico rappresentante la densità relativa espressa in % del contenuto proteico di TAU fosforilata in posizione 181 (TAU-P181Thr) nell'ippocampo di animali lesionati al sistema colinergico (SINGLE Les) ed a cui è stata somministrata anche della beta-amiloide pre-aggregata (DOUBLE), confrontati con i valori ottenuti da animali normali (CTRL). Dall'analisi risulta che negli animali lesionati, sia SINGLE Les che DOUBLE, c'è un aumento significativo dei livelli della forma fosforilata di questa proteina, che arrivano ad essere quasi il doppio rispetto a quelli di animali di controllo (CTRL), mentre non differiscono tra i gruppi di lesionati. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

#### 4.2.4.4 TDP-43

A partire da omogenati di tessuto ippocampale appartenente ai gruppi CTRL, SINGLE Les e DOUBLE è stata effettuata un'analisi tramite Western Blot in modo da poter valutare gli effetti dei trattamenti utilizzati sui livelli relativi della proteina transactive response DNA-binding protein di 43 kDa (TDP-43). Questa procedura ha permesso di visualizzare delle bande immunoreattive per TDP-43 che sono mostrate in Fig. 4.31.A.

In Fig. 4.31.B si può invece osservare il risultato dell'analisi densitometrica di tali bande, che mette a confronto i livelli relativi di proteina nell'ippocampo degli animali che

hanno ricevuto l'infusione dell'immunotossina 192-IgG-sap in MS, DBB e NBM (SINGLE Les) e di quelli che sono stati anche inoculati con beta-amiloide 25-35 pre-aggregata (DOUBLE), con quelli trovati in animali di controllo (CTRL). I risultati ottenuti confermano quanto visto tramite analisi immunohistologica, evidenziando un netto e significativo ( $p < 0,05$ ) aumento dei livelli di TDP-43 nei tessuti degli animali lesionati (sia SINGLE Les che DOUBLE); infatti negli ippocampi appartenenti a questi due gruppi la densità relativa risulta essere di 2,5 volte superiore rispetto a quella dei controlli (CTRL). Non si notano invece differenze tra i due gruppi di lesionati.



**Fig. 4.31: A)** Esempi di bande immunoreattive per TDP-43 ottenute tramite analisi con Western Blot. **B)** Densità relativa espressa in % del contenuto proteico di TDP-43 nell'ippocampo di animali lesionati al sistema colinergico (SINGLE Les) ed a cui è stata somministrata anche della beta-amiloide pre-aggregata (DOUBLE), confrontati con i valori ottenuti da animali normali (CTRL). Dall'analisi risulta che negli animali lesionati, sia SINGLE Les che DOUBLE, c'è un aumento significativo dei livelli di questa proteina, che superano di 2,5 volte quelli degli animali di controllo (CTRL), mentre non differiscono tra i gruppi di lesionati. (\* indica una performance significativamente peggiore rispetto ai controlli, dove  $p < 0,05$ )

## 5. *Discussione*

La malattia di Parkinson (PD) e quella di Alzheimer (AD) appartengono entrambe ad una vasta famiglia di malattie neurodegenerative con decorso progressivo. Diversi studi ipotizzano che esse possano essere la diversa manifestazione di uno stesso processo disfunzionale [Appel, 1981; Eisen e Calne, 1992; Perl et al, 1998; Dunnett e Bjorklund, 1999; Marien et al, 2004], poichè presentano vari aspetti neuropatologici in comune. Ambedue infatti sono caratterizzate da una deplezione massiva dei sistemi neurotrasmettitoriali a proiezione diffusa (quali ad esempio il colinergico [Bartus et al, 1982; Coyle et al, 1983; Nakano e Hirano, 1984; Perry et al, 1985], il dopaminergico [Mann et al, 1987; Reinikainen et al, 1990; McRitchie et al, 1997] ed il noradrenergico [Chan-Palay, 1991; Zarow et al, 2003; Marien et al, 2004]) e dalla comparsa di aggregati proteici aberranti in *corteccia* ed *ippocampo* (le placche senili contenenti beta-amiloide 1-42 ed i grovigli neurofibrillari al cui interno si trova la proteina tau-fosforilata sono peculiarità dell'AD, mentre i corpi di Lewy costituiti da alfa-sinucleina ubiquinata solitamente sono considerati essere segni neuropatologici tipici del PD, anche se in diversi casi si è visto che non sempre questa distinzione viene mantenuta e che spesso si può essere in presenza di proteinopatie miste [Hakim e Mathieson, 1979; Boller et al, 1980; Gaspar e Gray, 1984; Leverenz e Sumi, 1986; Ditter e Mirra, 1987; Duyckaerts et al, 2009]), inoltre sono associate all'insorgenza di disturbi cognitivi ed allo sviluppo di demenza. [Celesia e Wanamaker, 1972; Hakim e Mathieson, 1979; Larson et al, 1992; Mattila et al, 2000; Bosboom et al, 2004; Muslimovic et al, 2005; Borek et al, 2006]

Tuttavia, nonostante la presenza di degenerazione neuronale [Davies e Maloney, 1976; Perry, 1980; Whitehouse et al, 1982; Candy et al, 1983; Whitehouse et al, 1983; Nakano e Hirano, 1984; Tagliavini et al, 1984; Chan-Palay e Asan, 1989; Gaspar et al, 1991; Dringenberg, 2000], che sia di proteinopatie [Hardy e Allsop, 1991; Braak e Braak, 1991; Brion et al, 1991; Goedert, 1996; Taylor et al, 2002; Braak et al, 2003 e 2006], è ben documentata in pazienti affetti da PD e AD, quello che è ancora ampiamente da indagare è in che modo, la comparsa di queste disfunzioni anatomiche e neurochimiche, influenzi il processo patologico, ed in particolare determini lo sviluppo di deficit cognitivi.

Pertanto, con questo lavoro di tesi si è voluto andare ad approfondire:

- il contributo apportato dalla disfunzione del sistema colinergico del *prosencefalo di base*, di quello dopaminergico mesocorticolimbico e del sistema noradrenergico ascendente, nel determinare la comparsa di disturbi della cognizione.

Questa ricerca è stata effettuata usando il ratto come animale modello, in cui, attraverso l'iniezione neonatale di due immunotossine (192-IgG-saporina e anti-DBH-

saporina) e di una neurotossina (6-OHDA) in età adulta, è stato possibile osservare le conseguenze funzionali ed anatomiche della deplezione dei corrispettivi sistemi (colinergico, noradrenergico e dopaminergico), lesionati in modo singolo o combinato, tramite l'utilizzo di appropriati test comportamentali e procedure istochimiche.

- gli effetti derivanti dalla deplezione del sistema colinergico del *prosencefalo di base* con o senza l'aggiunta dell'infusione di beta-amiloide 25-35 pre-aggregata in ippocampo, sull'apprendimento e la memoria spaziale dei ratti così trattati e le conseguenze neurochimiche sui tessuti prelevati da questi *post-mortem*, soprattutto per quanto riguarda le alterazioni del metabolismo delle proteine APP, TAU e TDP-43, indagate tramite tecniche istologiche specifiche ed analisi con Western Blot.

## 5.1 DISFUNZIONE DELLA REGOLAZIONE MONOAMINERGICA NEL RATTO

Nella malattia di Parkinson la comparsa di sintomi motori e la loro gravità sono state correlate direttamente alla perdita di neuroni dopaminergici della *Substantia Nigra* (SN), e nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi modelli animali che hanno confermato tale ipotesi. [Fahn et al, 1971; Duty e Jenner, 2011; Blandini e Armentero, 2012] Pochi studi però sono stati rivolti ad indagare in che modo la degenerazione dei sistemi neurali extra-nigrali è coinvolta nella comparsa dei sintomi non-motori (disturbi cognitivi e demenza) di questa malattia. Si è visto che gli stessi sistemi, che vanno incontro a degenerazione nel PD associato a demenza, presentano delle disfunzioni anche in altre malattie in cui le funzioni cognitive vengono meno, un esempio lampante di ciò è rappresentato dalla patologia di Alzheimer (AD). [Marien et al, 2004] In entrambe queste malattie i neuroni colinergici appartenenti al *prosencefalo di base* (BF), quelli dopaminergici contenuti nell'*area tegmentale ventrale* (VTA), quelli noradrenergici del complesso *Locus Coeruleus/Sub-Coeruleus* (LC/SubC) degenerano o presentano delle inclusioni patologiche di proteine (quali beta-amiloide, tau-fosforilata, alfa-sinucleina, TDP-43). [Hakim e Mathieson, 1979; Boller et al, 1980; Whitehouse et al, 1982; Nakano e Hirano, 1984; Perry et al, 1985; Leverenz e Sumi, 1986; Ditter e Mirra, 1987; Chan-Palay, 1991; McRitchie et al, 1997; Braak et al, 2003; Duyckaerts et al, 2009; Bigio, 2008; Wilson et al, 2011]

Diverse ipotesi sono state formulate per cercare di spiegare in che modo la disfunzione di questi sistemi possa concorrere alla patogenesi di queste malattie (per approfondimento vedere i capitoli 1.1.2.1 e 1.1.3.1 dell'introduzione di questa tesi), ma nessun lavoro fin'ora ha esaminato gli effetti della loro deplezione selettiva, singola o combinata, sulla cognizione. Per questo, usando il ratto come animale modello, e sfruttando

l'efficacia e la selettività delle immunotossine 192-IgG-sap e anti-DBH-sap, rispettivamente sul sistema colinergico e noradrenergico, ed andando a "colpire" i neuroni dopaminergici della VTA in loco con l'iniezione stereotassica della neurotossina monoaminergica 6-OHDA, abbiamo analizzato le conseguenze di varie combinazioni lesive sull'apprendimento e la memoria spaziale degli animali così trattati. In particolare abbiamo indagato gli effetti di questi trattamenti sulla *reference memory* con il *Morris Water Maze* (MWM) test e quelli sulla *working memory* con il *Radial Arm Water Maze* (RAWM) test.

Gli animali in test sensoriali-motori preliminari (quali il Cue-test) non hanno evidenziato disturbi nelle capacità visive e natatorie, la velocità media dei vari gruppi è risultata essere simile (tra i 0,2-0,3 m/s), quindi abbiamo assunto che tutte le differenze che sono state rilevate nei test successivi fossero dovute esclusivamente a disfunzioni di tipo cognitivo.

Da quanto è emerso dai dati ottenuti tramite MWM test non risultano esserci differenze significative nelle capacità di memoria di riferimento spaziale dei vari gruppi analizzati e nemmeno nella loro strategia di ricerca della piattaforma, anche quando si è andati a ledere in contemporanea tutti e tre i sistemi presi in esame (TRIPLE Les). Tutti gli animali infatti sono stati in grado di eseguire questo compito senza apparenti difficoltà, riducendo progressivamente sia la distanza che il tempo impiegato per raggiungere il target, e dimostrando durante lo *Spatial Probe Trial* (SPT) di concentrare il loro nuoto esclusivamente nel quadrante di SW della vasca, dove era posizionata la piattaforma durante i precedenti 7 giorni di MWM test.

Invece è stata evidenziata la presenza di importanti deficit nella memoria di lavoro in tutti i gruppi che hanno subito la lesione al sistema noradrenergico, singola o combinata a quella del sistema colinergico e/o dopaminergico, quando si è andati ad analizzare la percentuale di miglioramento di questi gruppi tra la prestazione effettuata nella prima e nella seconda prova del RAWM test, confrontandola con quella di animali di controllo.

Durante il RAWM test gli animali si ritrovano a dover processare delle informazioni ottenute nel breve termine ed a doverle elaborare in modo rapido per poter concludere il test in maniera efficiente. Questo compito, che è ippocampo-dipendente, è più complicato rispetto al semplice orientamento ed apprendimento spaziale richiesto durante il MWM test, che coinvolge invece l'attivazione di meccanismi di memoria a lungo termine e di consolidamento, che sottostanno prevalentemente al funzionamento dei sistemi neurali presenti in corteccia frontale e prefrontale. Infatti, durante l'esecuzione del RAWM test l'animale deve dimostrare di apprendere, comprendere e ragionare, ponendo attenzione e mettendo a confronto le informazioni ottenute nelle prove precedenti con quelle relative al trial in corso. [Baddeley, 1986]



Quindi, dai risultati ottenuti nei test comportamentali non siamo riusciti a vedere la comparsa di deficit nell'immagazzinamento o nel consolidamento della memoria a medio-lungo termine, che sono basati sulla funzionalità dei circuiti neocorticali (in particolare frontali e prefrontali), in nessuna tipologia o combinazione di lesione, nonostante i risultati istologici effettuati sui tessuti prelevati da questi animali hanno dimostrato un'evidente denervazione corticale a livello delle efferenze di tutti e tre i sistemi neurotrasmettitoriali presi in esame. Mentre, grazie all'analisi delle capacità di *working memory* di questi animali, è emerso un chiaro ruolo del sistema noradrenergico nel regolare i processi cognitivi che dipendono dall'ippocampo e nel compensare, quando presente, la disfunzione del sistema colinergico e di quello dopaminergico.

Quanto trovato è risultato per alcuni aspetti in contrasto con il lavoro effettuato da Wisman e collaboratori [Wisman et al, 2008], in particolare rispetto agli effetti ottenuti nella *reference memory* dopo la lesione dei neuroni dopaminergici della VTA con la 6-OHDA in ratti adulti. In questo lavoro infatti, gli animali, a cui è stata somministrata una quantità di tossina pari a quella utilizzata anche da noi durante le procedure chirurgiche, e testati con lo stesso paradigma comportamentale, hanno evidenziato dei deficit nel processo di consolidamento della memoria tra il quinto ed il settimo giorno di MWM test, non rilevati invece dai nostri risultati. I dati ottenuti in questo lavoro sembrano in linea con quanto riportato anche da un altro studio, in cui attraverso il blocco di recettori D1 in corteccia frontale-mediale viene ottenuta l'inibizione della formazione della memoria a lungo termine [Izquierdo et al, 2007]. Quindi, il ruolo della dopamina nel mediare a livello corticale il processo di consolidamento delle informazioni apprese è difficile da confutare. Questa discrepanza non è facile da spiegare nemmeno a livello di efficacia della lesione, in quanto in entrambi i lavori (il nostro e quello di Wisman et al) è presente uno stesso pattern di neurodegenerazione, in cui si osserva nella VTA una deplezione di neuroni dopaminergici TH-positivi di circa il 45%. Quello che si può assumere è che nel nostro caso ci sia stato l'intervento di qualche sistema di compensazione, diverso dal sistema colinergico e da quello noradrenergico, che è riuscito a supplire funzionalmente alla perdita degli input dopaminergici corticali. Infatti, mentre noi siamo intervenuti chirurgicamente quando gli animali presentavano 2 mesi di età, nel lavoro di Wisman e collaboratori i ratti sono stati lesionati a 3 mesi di vita. Questa differenza temporale potrebbe essere la causa dei diversi risultati ottenuti. Infatti, nel ratto il sistema dopaminergico raggiunge la sua piena attività soltanto durante il terzo mese post-natale, stabilizzandosi poi per i successivi 9 mesi di vita. [Restani et al, 1990] Quindi si potrebbe ipotizzare che a due mesi di vita, le regioni corticali raggiunte dalle efferenze dopaminergiche, siano ancora permissive all'intervento di qualche sistema di compensazione, mentre questa plasticità viene persa a tre mesi, quando il sistema dopaminergico raggiunge la sua piena attività.

I risultati ottenuti dall'analisi delle capacità di *working memory* negli animali lesionati al sistema dopaminergico che origina dalla VTA o al sistema colinergico del BF sono invece in linea con quanto osservato anche da Wisman e collaboratori [Wisman et al, 2008], infatti non vengono rivelati deficit dipendenti dalla disfunzione di questi due sistemi in nessuno dei casi. Mentre, per quanto riguarda gli animali lesionati sia al sistema dopaminergico che a quello colinergico, nel nostro caso vengono rilevati dei lievi deficit nella capacità di memoria di lavoro, mentre appaiono più gravi in quello di Wisman e collaboratori. Anche qui, l'età in cui è stata effettuata la lesione può essere un fattore determinante nel creare questa differenza. Infatti il nostro modello di neurodegenerazione colinergica ha previsto la lesione in età neonatale, che invece è stata eseguita in adulto nel lavoro di Wisman e collaboratori. [Wisman et al, 2008] Lesionare il sistema colinergico in età neonatale, quando l'ambiente cerebrale è più plastico, potrebbe infatti comportare l'intervento di sistemi che possono compensare alle sue funzioni, mentre questo meccanismo può risultare più difficile in età adulta quando i territori cerebrali sono già stati pienamente innervati da connessioni stabili ed in piena attività. Un candidato importante ad avere questo ruolo di supporto potrebbe essere il sistema noradrenergico. E' stato visto infatti che dopo lesione neonatale con l'immunotossina 192-IgG-saporina c'è un aumento significativo nei livelli cerebrali di noradrenalina [Leanza et al, 1996], inoltre avviene una proliferazione di spesse fibre noradrenergiche nell'ippocampo provenienti dal ganglio cervicale superiore (SCG), come è stato osservato da Pappas e collaboratori [Pappas et al, 1996], che sia da noi attraverso l'analisi immunostochimica effettuata per la rilevazione dell'enzima DBH nell'innervazione che raggiunge il giro dentato degli animali appartenenti ai gruppi ACh-NA Les e TRIPLE Les.

L'importanza del ruolo del sistema noradrenergico nello svolgimento di compiti ippocampo-dipendenti e nella plasticità sinaptica è apparso evidente quando abbiamo analizzato la latenza e gli errori che sono stati effettuati dagli animali lesionati a tale sistema durante il RAWM test. Infatti, tramite l'analisi dei *Savings*, in questi animali sono stati osservati dei deficit significativi alla memoria di lavoro, che compaiono già quando il sistema noradrenergico viene lesionato singolarmente, e che si aggravano quando la sua deplezione è combinata a quella del sistema colinergico del BF e del sistema dopaminergico che origina dalla VTA.

Diversi studi farmacologici hanno dimostrato che il sistema noradrenergico è implicato in vari fenomeni cognitivi, quali il consolidamento ed il recupero (*retrieval*) delle tracce mnemoniche, nell'attenzione e nella percezione. [Sara, 1985 e 1998; Devauges e Sara, 1991; Tronel et al, 2004] Dal nostro lavoro non abbiamo visto effetti sul consolidamento della memoria a medio-lungo termine in seguito alla deplezione di questo sistema, in quanto non sono emerse differenze significative tra le performance di animali trattati con l'immunotossina anti-DBH-saporina rispetto ai controlli durante il MWM test; mentre i deficit

osservati durante il RAWM potrebbero implicare il coinvolgimento di meccanismi di attenzione e di recupero dell'informazione, in quanto attraverso questi processi avviene l'integrazione tra le conoscenze pregresse ed i nuovi stimoli spaziali a cui l'animale è sottoposto durante i diversi trial, risultando quindi essenziali per la corretta funzionalità della *working memory*. [Tulving e Thompson, 1973]

Gli effetti del ruolo del sistema noradrenergico nei fenomeni di plasticità sinaptica e di riorganizzazione delle reti neurali, specialmente durante le fasi di sviluppo del SNC, sono invece osservabili quando si vanno ad analizzare le interazioni funzionali che presenta con gli altri due sistemi neurotrasmettitoriali a proiezione diffusa presi in esame. Infatti, i deficit nella memoria di lavoro risultano essere più gravi quando le lesioni di questi sistemi sono combinate insieme, mentre come è stato esposto prima, non producono problemi cognitivi significativi quando vengono effettuate in modo singolo. Si può quindi assumere che il sistema noradrenergico cooperi funzionalmente con il sistema colinergico e con quello dopaminergico durante i processi di apprendimento e memoria spaziale, e riesca a compensare la loro mancanza. Questo è molto importante nel caso ad esempio di patologie neurodegenerative quali la malattia di Alzheimer e quella di Parkinson, in cui tra l'altro da studi clinici è stato visto esserci una massiva degenerazione precoce dei neuroni noradrenergici appartenenti al LC che correla con la gravità dei sintomi cognitivi [Mann et al, 1985; German et al, 1992; Zweig et al, 1993; Zarow et al, 2003], in quanto terapie farmacologiche o ristorative che hanno come target il sistema noradrenergico potrebbero essere utili ad incrementare le capacità cognitive dei pazienti che ne sono affetti.

Attualmente nel nostro laboratorio ci stiamo muovendo in questa direzione, studiando la possibilità di ottenere una reinnervazione noradrenergica, o comunque un recupero di funzione, in animali lesionati da neonati al sistema noradrenergico con l'immunotossina anti-DBH-saporina, e trapiantati da adulti in ippocampo con progenitori neurali derivanti da *Locus Coeruleus* embrionale.

## **5.2 EFFETTI NEUROPATOLOGICI INDOTTI DA DEPLEZIONE COLINERGICA ED INFUSIONE IPPOCAMPALE DI BETA-AMILOIDE PRE-AGGREGATA NEL RATTO**

La malattia di Alzheimer, in aggiunta alla degenerazione dei sistemi neurali, è caratterizzata a livello neuropatologico dall'accumulo di placche senili contenenti il peptide beta-amiloide e di aggregati neurofibrillari al cui interno si trova la proteina tau-fosforilata. [Hardy e Allsop, 1991; Braak e Braak, 1991; Brion et al, 1991; Goedert, 1996; Taylor et al, 2002] Recentemente, diversi lavori hanno dimostrato che nei tessuti cerebrali di molti individui affetti da AD sono presenti anche delle anomali inclusioni citoplasmatiche di TDP-

43, ritrovate solitamente in casi di SLA o FTLD. [Amador-Ortiz et al, 2007; Hu et al, 2008; Lippa et al, 2009; Gendron et al, 2010] Inoltre è stato visto che la quantità di questa proteina, in tali pazienti, risulta essere raddoppiata rispetto ai normali valori fisiologici. [Herman et al, 2011] Nonostante i numerosi studi svolti *in vitro* ed *in vivo* sui diversi aspetti che caratterizzano l'AD, ad oggi non si è ancora riusciti ad avere una visione completa dei meccanismi che conducono allo sviluppo di queste alterazioni patologiche. Inoltre, le relazioni che intercorrono tra i diversi cambiamenti molecolari, le lesioni neuropatologiche e le conseguenti disfunzioni funzionali devono essere ancora ampiamente indagate.

Per questo motivo, riproducendo nel ratto alcune caratteristiche patologiche tipiche dell'AD, quali la perdita di neuroni colinergici nel *prosencefalo di base* e l'accumulo di beta-amiloide nel territorio ippocampale, in modo singolo o combinato, siamo andati a studiare i loro effetti a livello cognitivo (analizzando in particolare le conseguenze sulla *reference* e la *working memory*), a livello anatomico (ricercando immunostochimicamente la presenza di alterazioni tissutali) ed a livello neurochimico (indagando tramite Western Blot le possibili modificazioni avvenute nel metabolismo delle proteine APP, TAU e TDP-43).

La lesione al sistema colinergico è stata effettuata nei nuclei colinergici del *prosencefalo di base* (MS, DBB e NBM) di animali adulti tramite infusione per stereotassia dell'immunotossina 192-IgG-sap, mentre l'accumulo di beta-amiloide nell'ippocampo è stato sviluppato tramite l'inoculo locale del peptide beta-amiloide 25-35 pre-aggregato. Si è scelto di utilizzare questo particolare frammento peptidico, perchè in studi precedenti è stato visto avere, al pari della beta-amiloide 1-42, una notevole capacità di aggregazione, di essere in grado di indurre cambiamenti neurofisiologici nelle cellule coltivate *in vitro* (ad esempio provoca la retrazione dei dendriti in neuroni differenziati) e di causare un'elevata neurotossicità *in vivo*. [Pike et al, 1991; Delobette et al, 1997; Tran et al, 2002; Meunier et al, 2006]

La lesione con 192-IgG-sap è risultata essere altamente selettiva ed efficace, come si è osservato dall'analisi istochimica dei tessuti processati per la rilevazione di ChAT ed AChE, da cui è emersa una profonda deplezione cellulare e denervazione colinergica nei tessuti degli animali trattati con tale immunotossina (SINGLE Les e DOUBLE).

Mentre, gli aggregati di beta-amiloide 25-35, dopo 2 mesi, sono stati ritrovati essere localizzati in ippocampo, la sede dove era avvenuta l'iniezione.

Al livello cognitivo si sono osservati gravi deficit di apprendimento e memoria spaziale nel gruppo di animali che ha ricevuto entrambi i trattamenti (DOUBLE). Questo gruppo infatti ha mostrato maggiori difficoltà rispetto agli altri ad eseguire sia il MWM test che il RAMW test, non mostrando nemmeno di avere una precisa strategia di ricerca spaziale durante lo SPT. Durante il RAWM test, il gruppo dei singoli lesionati al sistema colinergico (SINGLE Les) ha mostrato di avere delle disfunzioni maggiori, anche se non significative, nella

*working memory* rispetto al gruppo trattato con la sola beta-amiloide 25-35 pre-aggregata (SINGLE Amy). Da quanto osservato possiamo dedurre che a livello funzionale esiste una sinergia tra la disfunzione colinergica e l'accumulo di beta-amiloide, infatti mentre questi trattamenti da soli non hanno praticamente nessun effetto sulla cognizione, quando sono combinati producono dei deficit molto gravi, che correlano con quelli trovati in pazienti affetti da AD.

Il meccanismo che sta dietro a questa interazione funzionale potrebbe essere spiegato alla luce dell'influenza che il sistema colinergico possiede sul processamento di APP; infatti da dati in letteratura si sa che in assenza di attività recettoriale muscarinica viene privilegiata la via amiloidogenica. [Auld et al, 2002; Yan e Feng, 2004; Kar et al, 2004; Fisher, 2012] Inoltre è noto che l'infusione di beta-amiloide esogena nell'ippocampo provoca infiammazione locale [Giovannini et al, 2002] e che questo processo, attraverso la produzione di citochine, quali ad esempio l'interleuchina-1 (IL-1), induce un'aumentata sintesi di APP e di conseguenza una maggiore produzione ed accumulo di beta-amiloide. [Rogers et al, 1998]

Quindi, nel nostro caso, la singola iniezione di beta-amiloide nell'ippocampo potrebbe attivare una cascata infiammatoria che a sua volta andrebbe ad indurre l'aumento dell'espressione di APP, ma che grazie all'azione della trasmissione colinergica non produce ulteriore beta-amiloide, riuscendo ad arginare quindi la propagazione dell'effetto tossico. Invece, la lesione singola al sistema colinergico non basta ad indurre una deposizione di beta-amiloide tale da pregiudicare le funzioni cognitive, perchè altri sistemi neuronali possono compensare la sua mancanza (come si è visto dallo studio esposto in precedenza in questa tesi) oppure perchè l'incremento di produzione di APP non viene stimolato dalla sola perdita neuronale. Quando però alla deplezione colinergica viene associata anche la deposizione di beta-amiloide esogena, si crea un processo infiammatorio che aumenta la produzione di APP, e non essendoci più il sistema colinergico ad inibire la produzione di beta-amiloide endogena, quest'ultima potrebbe accumularsi nei tessuti e causare la disfunzione anche di altri sistemi, gli stessi ad esempio che supplivano alle funzioni interdette dalla perdita colinergica, ed in questo modo provocare un peggioramento dei deficit cognitivi.

Sarebbe quindi interessante andare a vedere se effettivamente nel gruppo dei DOUBLE esiste un accumulo di beta-amiloide endogena, quest'indagine infatti non è ancora stata effettuata.

Intanto, per quanto riguarda i livelli relativi di APP in ippocampo, analizzati tramite Western Blot, si è osservato un aumento del 50% di questa proteina nel gruppo dei DOUBLE rispetto ai valori ricavati da animali di controllo, mentre nel gruppo dei SINGLE Amy si è registrato un aumento solo del 10% ed in quello dei SINGLE Les del 20%. Nonostante ci sia una tendenza, queste differenze non sono risultate però abbastanza significative da poter confermare con questi dati la teoria sopra esposta. Molto probabilmente sono necessari più di 2 mesi dopo l'intervento chirurgico per poter rilevare delle differenze significative di

espressione di questa proteina, infatti in altri lavori in cui questa analisi è stata effettuata dopo 6 o 8 mesi si è visto un incremento più marcato dei livelli di questa proteina negli animali lesionati. [Leanza et al, 1998; Lin et al 1998; Aztiria et al, 2009]

La comparsa dei deficit cognitivi sembra quindi precedere la disfunzione di APP, perciò altri fattori potrebbero essere coinvolti nell'interazione funzionale che è stata evidenziata esistere tra la disfunzione colinergica e l'accumulo di beta-amiloide nel modello animale da noi analizzato.

Come è stato già detto, oltre alle placche senili costituite da beta-amiloide, un'altra caratteristica dell'AD è la presenza di aggregati neurofibrillari intracellulari. Questi sono composti prevalentemente dalla proteina Tau-iperfosforilata. [Kosik et al, 1986; Goedert, 1996] Tau fisiologicamente svolge un ruolo importante nell'organizzazione dei microtubuli, promuovendone l'assemblamento e stabilizzandoli [Weingarten et al, 1975; Drubin e Kirschner, 1986; Brandt e Lee, 1993; Panda et al, 1995]. Sembra che la fosforilazione di questa proteina possa conferirle tossicità. [Barghorn et al, 2000] Infatti, in questo stato Tau si distacca dai microtubuli, conducendo a disfunzioni nel trasporto assonale, e si auto-aggrega in fibrille, che possono avere un effetto deleterio sulla funzionalità citoplasmatica delle cellule, conducendo queste a morte. [Lu e Wood, 1993] Da alcuni studi risulta che gli oligomeri di beta-amiloide possono promuovere l'iperfosforilazione di Tau andando ad attivare delle chinasi, quali MAPK e GSK-3 [Zheng et al, 2002; Chrouch et al, 2008; Tokutake et al, 2012], e che agonisti colinergici, agendo su recettori muscarinici, possono regolare questo processo. [Kar et al, 2004] Quindi, partendo da tali presupposti, siamo andati ad indagare se la deplezione colinergica e l'accumulo ippocampale di beta-amiloide ottenute nel nostro modello, possano influenzare l'espressione della proteina Tau e la sua fosforilazione. Dalle analisi immunoistochimiche è emerso che c'è un accumulo di Tau-fosforilata (TAU-P181Thr) nel citoplasma dei neuroni ippocampali e corticali degli animali trattati con l'immunotossina 192-IgG-sap, in modo singolo o combinato all'infusione della beta-amiloide 25-35 pre-aggregata (SINGLE Les e DOUBLE). E' stato scelto di analizzare la fosforilazione di Tau basandoci sullo stato della treonina-181 poichè da uno studio effettuato da Mitchell [Mitchell, 2009] è risultato essere un buon biomarker per l'indagine di malattie neurodegenerative quali l'AD. Da quanto sappiamo, la presenza di Tau nel compartimento somato-dendritico rappresenta uno dei primi segni di neurodegenerazione, infatti la sua corretta localizzazione sarebbe negli assoni. [Braak et al, 2006] Quindi possiamo affermare che la deplezione colinergica effettuata nel nostro modello ha un chiaro effetto nello stimolare la dislocazione di Tau ed a provocarne la fosforilazione, aumentando di conseguenza la formazione di grovigli neurofibrillari, anche in assenza di aggregati di beta-amiloide, ed è in grado di per sè di propagare il danno cellulare ad altre popolazioni neuronali.

Dall'analisi dei livelli relativi di proteina Tau totale e Tau-fosforilata sulla treonina 181, effettuata tramite Western Blot, non emergono differenze nella quantità totale di proteina Tau presente nell'ippocampo tra i gruppi esaminati, mentre si dimostra un chiaro aumento della fosforilazione di questa in entrambi i gruppi che hanno ricevuto la lesione al sistema colinergico, con o senza l'accumulo di beta-amiloide nel territorio ippocampale; confermando quanto visto già dall'analisi istologica. In entrambi i gruppi di animali lesionati con 192-IgG-sap c'è un aumento simile della quantità di fosforilazione di questa proteina, che supera dell'80-90% i valori ottenuti dai controlli, facendo presupporre che la sola lesione al sistema colinergico sia sufficiente a creare questo incremento di fosforilazione. Anche qui però, come nel caso di APP, si potrebbero venire a creare delle differenze tra i due gruppi di lesionati andando ad effettuare le analisi dopo un tempo di sopravvivenza maggiore (6-8 mesi), in quanto gli effetti dell'accumulo di beta-amiloide esogena nei tessuti cerebrali potrebbero necessitare di un periodo più ampio di 2 mesi per esplicarsi. Oltre a questo aspetto, rimane poi da chiarire l'effetto su Tau provocato dalla sola infusione di beta-amiloide a livello ippocampale, che per motivi tecnici non siamo ancora riusciti ad indagare.

Gli effetti della deplezione colinergica sulla fosforilazione ed aggregazione di Tau però potrebbero essere indiretti, e coinvolgere altri fattori regolati dal sistema colinergico. Ad esempio è stato visto che il gene MAPT, che codifica per la proteina Tau, è uno degli RNA bersaglio su cui agisce TDP-43 [Tremblay et al, 2011], per cui la perdita di funzione di TDP-43 potrebbe risultare in un'aumentata fosforilazione di Tau. Come è stato precedentemente accennato, alterazioni del metabolismo di TDP-43 sono state osservate in pazienti affetti da AD con percentuali che variano dal 57% dei casi nelle fasi iniziali, ad oltre il 75% negli stadi più avanzati della malattia. [Hu et al, 2008; Lippa et al, 2009] L'accumulo e la dislocalizzazione di TDP-43 nel citoplasma, in questi casi sono associati alla presenza di placche senili, di grovigli neurofibrillari e di sclerosi ippocampale; inoltre recentemente la disfunzione di questa proteina è stata correlata alla comparsa di deficit nella *working memory* e nelle funzioni esecutive, aspetti che caratterizzano la condizione di demenza. [Wilson et al, 2013] Il ruolo di TDP-43 nella patogenesi della malattia di Alzheimer tuttavia non è ancora abbastanza chiaro, e nessuno studio ha fin'ora esaminato gli effetti anatomici e neurochimici che l'ipofunzione colinergica potrebbe avere sul metabolismo di questa proteina. Quindi, per approfondire questo aspetto, abbiamo deciso di verificare tramite analisi immunostochimica l'espressione e la localizzazione di TDP-43 nei tessuti cerebrali prelevati dagli animali trattati con l'immunotossina 192-IgG-sap e la beta-amiloide 25-35 pre-aggregata. In questo modo è stato osservato che nei gruppi lesionati al sistema colinergico del *prosencefalo di base* (SINGLE Les e DOUBLE) l'immunoreattività per TDP-43 era presente anche a livello citoplasmatico dei neuroni ippocampali, a differenza dei controlli dove invece appariva confinata al solo compartimento nucleare. Dalla quantificazione del contenuto proteico

dell'ippocampo, effettuata tramite analisi densitometrica relativa delle bande ottenute dal Western Blot, si è potuto constatare invece un sostanziale aumento di TDP-43 nei tessuti degli animali lesionati al sistema colinergico, sia in associazione che non all'infusione locale di beta-amiloide pre-aggregata, i cui livelli sono risultati essere superiori di 2,5 volte rispetto a quelli degli animali controllo. Invece, l'espressione di TDP-43 non è apparsa differire tra il gruppo lesionato al solo sistema colinergico (SINGLE Les) e quello a cui è stata inoculata anche della beta-amiloide 25-35 pre-aggregata (DOUBLE), infatti questi mostrano rispettivamente un incremento del 150% e del 130% rispetto ai controlli.

Quindi, da quanto osservato, si potrebbe pensare che la disfunzione al sistema colinergico sia sufficiente di per sé ad alterare il metabolismo di TDP-43 e a provocarne sia la sovraespressione che l'accumulo citoplasmatico, mentre il ruolo della beta-amiloide in questo processo patologico sembrerebbe essere marginale o comunque intervenire in un periodo successivo.

Studi futuri potrebbero indagare maggiormente la relazione che intercorre tra la regolazione colinergica e l'espressione di TDP-43, per cercare di chiarire il meccanismo che sta alla base della loro consequenziale disfunzione. Inoltre, sarebbe interessante valutare gli effetti dell'accumulo degli aggregati di beta-amiloide in tempi più lunghi di sopravvivenza degli animali.

### 5.3 CONCLUSIONI

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti da questi lavori si può affermare che:

- Il sistema noradrenergico ha un importante ruolo nel corretto funzionamento della *working memory*.
- La deplezione del sistema colinergico del *prosencefalo di base* e di quello dopaminergico che origina dall'*area tegmentale ventrale*, può venire compensata funzionalmente dal sistema noradrenergico ascendente, in particolare per quanto riguarda l'esecuzione di compiti ippocampo-dipendenti.
- I sistemi di neuromodulazione a proiezione diffusa interagiscono funzionalmente tra loro nella regolazione dei processi cognitivi, specialmente in ambito di apprendimento e memoria spaziale.
- I processi di consolidamento delle informazioni nel ratto, che sottostanno alla regolazione dopaminergica mesocorticale, possono venire compensati dall'azione di altri sistemi neurali fino a tre mesi di età.
- I territori cerebrali che sono raggiunti dalle efferenze noradrenergiche provenienti dal *Locus Coeruleus* potrebbero essere resi più vulnerabili in seguito alla sua degenerazione.



- Terapie che mirano al ripristino funzionale del sistema noradrenergico potrebbero essere utili a potenziare i processi cognitivi dei pazienti affetti da AD e PD.
- L'associazione tra degenerazione colinergica ed infusione ippocampale di beta-amiloide esogena pre-aggregata determina gravi deficit cognitivi, sia nella *reference* che nella *working memory*.
- La lesione del sistema colinergico con l'immunotossina 192-IgG-saporina riesce ad indurre di per sè un aumento della fosforilazione della proteina Tau nei neuroni dell'ippocampo ed della corteccia frontale.
- L'accumulo e la dislocalizzazione di TDP-43 nei neuroni ippocampali sono associati alla disfunzione del sistema colinergico.
- Per rilevare gli effetti dell'interazione tra degenerazione colinergica ed infusione di beta-amiloide esogena pre-aggregata sulla sovraespressione di APP potrebbero essere necessari dei tempi di sopravvivenza più lunghi di 2 mesi.

## 6. Bibliografia

**Abi-Dargham A., Mawlawi O., Lombardo I., Gil R., Martinez D., Huang Y., Hwang D.R., Keilp J., Kochan L., Van Heertum R., Gorman J.M. and Laruelle M.** (2002) Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J. Neurosci.* 22: 3708–3719.

**Agid Y.** (1991) Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet.* 337: 1321–1324.

**Alexander G.E., DeLong M.R. and Strick P.L.** (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual Review of Neuroscience.* 9: 357-381.

**Alonso A. and Köhler C.** (1984) A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 225(3): 327-343.

**Alonso A.C, Grundke-Iqbal I. and Iqbal K.** (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* 2:783-787.

**Amador-Ortiz C., Lin W.L., Ahmed Z., Personett D., Davies P., Duara R., Graff-Radford N.R., Hutton M.L. and Dickson D.W.** (2007) TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Annals of neurology.* 61: 435-445.

**Amaral D.G. and Foss J.A.** (1975) Locus coeruleus lesions and learning. *Science.* 188(4186): 377-378.

**Amaral D.G. and Price J.L.** (1984) Amygdalo-cortical projections in the monkey (Macaca fascicularis). *J Comp Neurol.* 230:465–96.

**Anderson J.P., Chen Y., Kim K.S. and Robakis N.K.** (1992) An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein containing a potentially amyloidogenic sequence. *J. Neurochem.* 59(6): 2328-2331.

**Antonini V., Marrazzo A., Kleiner G., Coradazzi M., Ronsisvalle S., Prezzavento O., Ronsisvalle G. and Leanza G.** (2011) Anti-Amnesic and Neuroprotective Actions of the Sigma-1 Receptor Agonist (-)-MR22 in Rats with Selective Cholinergic Lesion and Amyloid Infusion. *Journal of Alzheimer's Disease.* 24:569–586

**Apostolova L.G. and Thompson P.M.** (2008) Mapping Progressive Brain Structural Changes in Early Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Neuropsychologia.* 46 (6): 1597-1612.

**Apostolova L.G., Hwang K.S., Medina L.D., Green A.E., Braskie M.N., Dutton R.A., Lai J., Geschwind D.H., Cummings J.L, Thompson P.M and Ringman J.M.** (2011) Cortical and hippocampal atrophy in patients with autosomal dominant familial Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorder.* 32: 118-125.

**Appel S.H.** (1981) A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 10: 499–505.

**Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y. and Oda T.** (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 602-611.

**Armstrong D.M., Bruce G., Hersh L.B. and Gage F.H.** (1987) Development of cholinergic neurons in the septal/diagonal band complex of the rat. *Brain Res.* 433(2): 249-256.

**Aston-Jones G., Rajkowski J. and Cohen J.** (2000) Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog. Brain Res.* 126: 165-182.

**Auld D.S., Kornecook T.J., Bastianetto S. and Quirion R.** (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology.* 68: 209-245.

**Avila J., Lucas J.J, Perez M. and Hernandez F.** (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84: 361-384.

**Avila J., de Barreda E.G., Pallas-Barazza N. and Hernandez F.** (2013) Tau and neuron aging. *Aging and Disease.* 4: 23-28.

**Ayala Y.M., Zago P., D'Ambrogio A., Xu Y.F., Petrucelli L., Buratti E. e Baralle F.E.** (2008) Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J. Cell. Sci.* 121:3778-3785.

**Aztiria E., Cataudella T., Spampinato S. and Leanza G.** (2009) Septal grafts restore cognitive abilities and amyloid precursor protein metabolism. *Neurobiol Aging.* 30(10): 1614-1625.

**Baba M., Nakajo S., Tu P.H., Tomita T., Nakaya K., Lee V.M., Trojanowski J.Q. and Iwatsubo T.** (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American journal of pathology.* 152: 879-884.

**Bachman E.S., BergerSweeney J., Coyle J.T. and Hohmann C.F.** (1994) Developmental regulation of adult cortical morphology and behavior: an animal model for mental retardation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12(4): 239-253.

**Baddelay A.D.** (1986) Working memory. *N.Y., Oxford Uni. Press.*

**Baker K.G., Tork I., Hornung J.P. and Halasz P.** (1989) The human locus coeruleus complex: an immunohistochemical and three dimensional reconstruction study. *Exp. Brain Res.* 77: 257-270.

**Ballatore C., Lee V.M.Y. and Trojanowski J.Q.** (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 663-672.

**Barghorn S., Zheng-Fischhofer Q., Ackmann M., Biernat J., von Bergen M., Mandelkow E.M. and Mandelkow E.** (2000) Structure, microtubule interaction, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry.* 39: 11714-11721.

**Barrow C.J. and Zagorski M.G.** (1991) Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science.* 253: 179-182.

**Bartus R.T., Dean III R.L., Beer B. and Lipka A.S.** (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 217: 408-414.

**Bartus R.T.** (2000) On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163: 495-529.

**Batchelor P.E., Armstrong D.M., Blaker S.N. and Gage F.H.** (1989) Nerve growth factor receptor and choline acetyltransferase colocalization in neurons within the rat forebrain: response to fimbria-fornix transection. *J. Comp. Neurol.* 284(2): 187-204.

**Bayer T.A.** (2013) Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders? *European Neuropsychopharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.03.007>

**Beal M.F.** (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2: 325-334.

**Becker J.T., Walker J.A. and Olton D.S.** (1980) Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Res.* 200(2): 307-320.

**Benilova I., Karran E. and De Strooper B.** (2012) The toxic A[beta] oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 29: 349-357.

**Bennett B.M., Reynolds J.N., Prusky G.T., Douglas R.M., Sutherland R.J. and Thatcher G.R.** (2007) Cognitive deficits in rats after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel NO mimetic nitrate ester. *Neuropsychopharmacology*. 32(3): 505-513.

**Berger-Sweeney J., Heckers S., Mesulam M.M., Wiley R.G., Lappi D.A. and Sharma M.** (1994) Differential effects on spatial navigation of immunotoxin-induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis. *J. Neurosci.* 14(7): 4507-4519.

**Berger-Sweeney J.** (1998) The effects of neonatal basal forebrain lesions on cognition: towards understanding the developmental role of the cholinergic basal forebrain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16(8): 603-612.

**Berridge C.W. and Waterhouse B.D.** (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Rev.* 42(1): 33-84.

**Bertram L. and Tanzi R.E.** (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* 115: 1449-1457.

**Beyer K. and Ariza A.** (2012) Alpha-synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 1-16.

**Bigio E.H.** (2008) TAR DNA-binding protein-43 in amyotrophic lateral sclerosis, fronto-temporal lobar degeneration, and Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 116 (2): 135-140.

**Blandini F. and Armentero M.T.** (2012) Animal models of Parkinson's disease. *The FEBS Journal.* 279: 1156-1166.

- Bohnen N.I. and Albin R.L.** (2011) The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav. Brain Res.* 221(2): 564-573.
- Boller F., Mizutani T., Roessmann U. and Gambetti P.** (1980) Parkinson disease, dementia, and Alzheimer's disease: clinicopathological correlations. *Ann. Neurol.* 7: 329-335.
- Bondareff W., Mountjoy C.Q., Roth M., Rossor M.N., Iversen L.L, Reynolds G.P. and Hauser D.L.** (1987) Neuronal degeneration in locus ceruleus and cortical correlates of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1: 256-262.
- Book A.A., Wiley R.G. and Schweitzer J.B.** (1992) Specificity of 192 IgG-saporin for NGF receptor-positive cholinergic basal forebrain neurons in the rat. *Brain. Res.* 590(1-2): 350-355.
- Borek L.L., Amick M.M. and Friedman J.H.** (2006) Non-motor aspects of Parkinson's disease. *CNS spectrums.* 11: 541-554.
- Bosboom J.L., Stoffers D. and Wolters E.** (2004) Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission.* 111: 1303-1315.
- Braak H. and Braak E.** (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82: 239-259.
- Braak H., Del Tredici K., Rub U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N. and Braak E.** (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 24: 197-211.
- Braak H., Ghebremedhin E., Rub U., Bratzke H. and Del Tredici K.** (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research.* 318: 121-134.
- Braak H., Alafuzoff I., Arzberger T., Kretzshmar H. and Del Tredici K.** (2006) Staging of Alzheimer's disease associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112: 389-404.
- Brady D.R., Phelps P.E. and Vaughn J.E.** (1989) Neurogenesis of basal forebrain cholinergic neurons in rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 47(1): 81-92.
- Brandt R. and Lee G.** (1993) Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 268: 3414-3419.
- Brion J.P., Hanger D.P., Bruce M.T., Couck A.M., Flament-Durand J. and Anderton B.H.** (1991) Tau in Alzheimer neurofibrillary tangles. N- and C-terminal regions are differentially associated with paired helical filaments and the location of a putative abnormal phosphorylation site. *Biochem. J.* 273: 127-133.
- Buccafusco J.J., Letchworth S.R., Bencherif M. and Lippiello P.M.** (2005) Long-lasting cognitive improvement with nicotinic receptor agonists: mechanisms of pharmacokinetic-pharmacodynamic discordance. *Trends Pharmacol. Sci.* 26(7): 352-360.
- Budini M. and Buratti E.** (2011) TDP-43 autoregulation: implications for disease. *J. Mol. Neurosci.* 45: 473-479.

**Buratti E., Dork T., Zuccato E., Pagani F., Romano M. and Baralle F.E.** (2001) Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote *in vitro* and *in vivo* CFTR exon 9 skipping. *The EMBO Journal*. 20 (7): 1774-1784.

**Buratti E. and Baralle F.E.** (2008) Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front. Biosci.* 13: 867-878.

**Buratti E. and Baralle F.E.** (2010) The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol.* 7(4): 420-429.

**Buresova O., Bolhuis J.J. and Bures J.** (1986) Differential effects of cholinergic blockade on performance of rats in the water tank navigation task and in a radial water maze. *Behav. Neurosci.* 100(4): 476-482.

**Burke W.J., Kumar V.B. and Pandey N** (2008) Aggregation of alpha-synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine. *Acta Neuropathologica.* 115: 193-203.

**Butterfield D.A., Castegna A., Lauderback C.M. and Drake J.** (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging.* 23(5): 655-664.

**Caccamo A., Magri A. and Oddo S.** (2010) Age-dependent change in TDP-43 levels in a mouse model of Alzheimer's disease are linked to beta amyloid oligomers accumulation. *Molecular Neurodegeneration.* 5: 51.

**Candy J.M., Perry R.H., Perry E.K., Irving D., Blessed G. and Fairbairn A.F.** (1983) Changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Neurol. Sci.* 59: 277-289.

**Capsoni S., Ugolini G., Comparini A., Ruberti F., Berardi N. and Cattaneo A.** (2000) Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(12): 6826-6831.

**Carnevale D., De Simone R. and Minghetti L.** (2007) Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* 6(6): 388-397.

**Castellani R.J, Perry G. and Smith A.M.** (2004) Prion disease and Alzheimer's disease: pathogenic overlap. *Acta Neurobiol. Exp.* 64: 11-17

**Castellanos F.X. and Tannock R.** (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 617-628.

**Celesia G.G. and Wanamaker W.M.** (1972) Psychiatric disturbances in Parkinson's disease. *Dis. Nerv. Syst.* 33: 577-583.

**Chafee M.V. and Goldman-Rakic P.S.** (1998) Matching patterns of activity in primate prefrontal area 8a and parietal area 7ip neurons during a spatial working memory task. *J Neurophysiol.* 79:2919-2940.

**Chan-Palay V. and Asan E.** (1989) Alterations in catecholamine neurons of the *locus coeruleus* in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J. Comp. Neurol.* 287: 373-392.

**Chan-Palay V.** (1991) Alterations in the locus coeruleus in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 88: 625–630.

**Chappell J., McMahan R., Chiba A. and Gallagher M.** (1998) A re-examination of the role of basal forebrain cholinergic neurons in spatial working memory. *Neuropharmacology.* 37(4-5): 481-487.

**Chen F., David D., Ferrari A. and Gotz J.** (2004) Posttranslational modifications of tau-role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr. Drug Targets.* 5: 503–515.

**Chesselet M.F.** (2008) In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp. Neurol.* 209: 22–27.

**Chrouh P.J., Harding S.M., White A.R., Camakaris J., Bush A.I. and Masters C.L.** (2008) Mechanisms of A-beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40: 181-198.

**Clayton D.F. and George J.M.** (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 21: 249–254.

**Colpaert F.** (1987) Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induce by reserpine in rat. *Neuropharmacology.* 26: 1431–1440.

**Compton D.M.** (1991) Serial learning: a review of the behavioral and physiological research with the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15(3): 363-374.

**Contestabile A. and Stirpe F.** (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants as agents for suicide transport and immunolesioning in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 5(10): 1292-1301.

**Coyle J.T. and Yamamura H.I.** (1976) Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res.* 118(3): 429-440.

**Coyle J.T. and Molliver M.E.** (1977) Major innervation of newborn rat cortex by monoaminergic neurons. *Science.* 196(4288): 444-447.

**Coyle J.T., Price D.L. and DeLong M.R.** (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* 219: 1184– 1190.

**Crook R., Verkkoniemi A., Perez-Tur J., Mehta N., Baker M., Houlden H., Farrer M., Hutton M., Lincoln S., Hardy J., Gwinn K., Somer M., Paetau A., Kalimo H., Ylikoski R., Pöyhönen M., Kucera S. and Haltia M.** (1998) A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4(4): 452-455.

**Cummings J.L.** (2004) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351: 56-67.

**Dahlstrom A. and Fuxe K.** (1964) Localization of monoamines in the lower brainstem. *Experientia.* 20(7): 398-399.

**Dartigues J.F.** (2009) Alzheimer's disease: a global challenge for the 21st century. *Lancet Neurol.* 8(12): 1082-1083.

**Davies P. and Maloney A.J.** (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2: 1403.

**Dawson T.M., Mandir A. and Lee M.** (2002) Animal models of PD: pieces of the same puzzle? *Neuron*. 35: 219-222.

**Deiana S., Platt B. and Riedel G.** (2011) The cholinergic system and spatial learning. *Behav. Brain Res.* 221(2): 389-411.

**DeKosky S.T., Harbaugh R.E., Schmitt F.A., Bakay R.A., Chui H.C., Knopman D.S., Reeder T.M., Shetter A.G., Senter H.J. and Markesbery W.R.** (1992) Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. *Ann. Neurol.* 32: 625-632.

**DeKosky S.T., Ikonomic M.D. and Gandy S.** (2010) Traumatic Brain Injury - Football, Warfare, and Long-Term Effects. *N. Engl. J. Med.* 363: 1293-1296.

**Delaville C., De Deurwaerdere P. and Benazzouz A.** (2011) Noradrenaline and Parkinson's Disease. *Front. Syst. Neurosci.* 5(31): 1-12

**Delobette S., Privat A. and Maurice T.** (1997) In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide (25-35) induced amnesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 319(1): 1-4.

**Devauges V. and Sara S.J.** (1991) Memory retrieval enhancement by *locus coeruleus* stimulation: evidence for mediation by beta-receptors. *Behav. Brain Res.* 43(1): 93-97.

**D'Hooge R. and De Deyn P.P.** (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews.* 36: 60-90.

**Dickson D.W.** (2009) Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3: 1-23.

**Di Porzio U., Zuddas A., Cosenza-Murphy D.B. and Barker J.L.** (1990) Early appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the mesencephalon of mouse embryos. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 8(5): 523-532.

**Ditter S.M. and Mirra S.S.** (1987) Neuropathologic and clinical features of Parkinson's disease in Alzheimer's disease patients. *Neurology.* 37: 754-760.

**Dong J., Atwood C.S., Anderson V.E., Siedlak S.L., Smith M.A., Perry G. and Carey P.R.** (2003) Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: raman microscopic evidence. *Biochemistry.* 42: 2768-2773.

**Dong S., Duan Y., Hu Y. and Zhao Z.** (2012) Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a re-evaluation of amyloid cascade hypothesis. *Translational Neurodegeneration.* 1:18.

**Dringenberg H.C.** (2000) Alzheimer's disease: more than a 'cholinergic disorder'-evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav. Brain Res.* 115: 235-249.

**Drubin D.G. and Kirschner M.W.** (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell. Biol.* 103: 2739-2746.



**Dubois B., Ruberg M., Javoy-Agid F., Ploska A. and Agid Y.** (1983) A subcortico-cortical cholinergic system is affected in Parkinson's disease. *Brain Research*. 288: 213-218.

**Dunn A.J. and Swiergiel A.H.** (2008) The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *Eur. J. Pharmacol.* 583(3): 186-193.

**Dunnett S.B. and Barth T.M.** (1991) Animal models of Alzheimer's disease and dementia (with an emphasis on cortical cholinergic system). *Behavioural Models in Psychopharmacology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 359-418.

**Dunnett S.B., Everitt B.J. and Robbins T.W.** (1991) The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci.* 14(11): 494-501.

**Dunnett S.B. and Fibiger H.C.** (1993) Role of forebrain cholinergic systems in learning and memory: relevance to the cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia. *Prog. Brain Res.* 98: 413-420.

**Dutta G., Zhang P. and Liu B.** (2008) The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22(5): 453-464.

**Duty S. and Jenner P.** (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology* 164: 1357-1391.

**Duyckaerts C., Potier M.C. and Delatour B.** (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115 (1): 5-38.

**Duyckaerts C., Delatour. B. and Potier M.C.** (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118: 5-36.

**Eckenstein F. and Sofroniew M.V.** (1983) Identification of central cholinergic neurons containing both choline acetyltransferase and acetylcholinesterase and of central neurons containing only acetylcholinesterase. *J. Neurosci.* 3(11): 2286-2291.

**Eisen A. e Calne D.** (1992) Amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and Alzheimer's disease: phylogenetic disorders of the human neocortex sharing many characteristics. *Can. J. Neurol. Sci.* 19:117-123.

**Ertekin-Taner N.** (2007) Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neurol. Clin.* 25 (3): 611-615.

**Everitt B.J., Robbins T.W., Gaskin M. and Fray P.J.** (1983) The effects of lesions to ascending noradrenergic neurons on discrimination learning and performance in the rat. *Neuroscience.* 10(2): 397-410.

**Fadda F., Cocco S. and Stancampiano R.** (2000) Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuroreport.* 11: 2265-2269.

**Fahn S., Libsch L.R. and Cutler R.W.** (1971) Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea and tremor. *Journal of the Neurological Sciences.* 14: 427-455.

**Feinstein D.L.** (1998) Suppression of astroglial nitric oxide synthase expression by norepinephrine results from decreased NOS-2 promoter activity. *J. Neurochem.* 70(4): 1484-1496.

**Feinstein D.L., Heneka M.T., Gavrilyuk V., Dello Russo C., Weinberg G. and Galea E.** (2002) Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain. *Neurochem. Int.* 41(5): 357-365.

**Fibiger H.C.** (1991) Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.* 14(6): 220-223.

**Finkel S.I.** (2001) Behavioural and psychological symptoms of dementia: a current focus for clinicians, researchers and caregivers. *J. Clin Psychiatry* 21: 62.

**Fisher A.** (2012) Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: prospective and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochem.* 120: 22-33

**Fiszman M.L., Zuddas A., Masana M.I., Barker J.L. and Di Porzio U.** (1991) Dopamine synthesis precedes dopamine uptake in embryonic rat mesencephalic neurons. *J. Neurochem.* 56: 392-399.

**Francis P., Palmer A., Snape M. and Wilcock G.K.** (1999) The cholinergic hypothesis Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 66: 137-147.

**Frautschy S.A., Yang F., Irizarry M., Hyman B., Saido T.C., Hsiao K. and Cole G.M.** (1998) Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 152(1): 307-317.

**Freeman T.B., Spence M.S., Boss B.D., Spector D.H., Strecker R.E., Olanow C.W. and Kordower J.H.** (1991) Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra. *Exp. Neurol.* 113: 344-353.

**Frost B., Jacks R.L. and Diamond M.I.** (2009) Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *The journal of biological chemistry.* 284 (19): 12845-12852.

**Fulop T., Larbi A., Wikby A., Mocchegiani E., Hirokawa K. and Pawelec G.** (2005) Dysregulation of T-cell function in the elderly: scientific basis and clinical implications. *Drug Aging.* 22: 589-603.

**Fulop T., Lacombe G., Cunnane S., Le Page A., Dupuis G., Frost E.H., Bourgade-Navarro K., Goldeck D., Larbi A. and Pawelec G.** (2013) Elusive Alzheimer's disease: can immune signatures help our understanding of this challenging disease? Part 2: new immune paradigm. *Discov. Med.* 15: 33-42.

**Fuster J.M.** (2000) Executive frontal functions. *Exp Brain Res.* 133: 66-70.

**Gandy S.** (2005) The role of cerebral amyloid accumulation in common forms of Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Investigation.* 115 (5): 1121-1129.

**Gaspar P. and Gray F.** (1984) Parkinson's disease: a neuropathological study of 32 cases. *Acta Neuropathol.* 64: 43-52.

**Gaspar P., Duyckaerts C., Alvarez C., Javoy-Agid F. and Berger B.** (1991) Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 30: 365-374.

**Gazzaniga M., Ivry R. e Mangun G.** (2005) *Neuroscienze cognitive.* Bologna: Zanichelli Editore.

**Gendron T.F., Josephs K.A. and Petrucelli L.** (2010) Review: Transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43): mechanisms of neurodegeneration. *Neurophatol. Appl. Neurobiol.* 36(2): 97-112.

**Gendron T.F. and Petrucelli L.** (2011) Rodent models of TDP-43 proteinopathy: investigating the mechanisms of TDP-43-mediated neurodegeneration. *J. Mol. Neurosci.* 45: 486-499.

**German D.C., Walker B.S., Manaye K., Smith W.K., Woodward D.J. and North A.J.** (1988) The human locus coeruleus: computer reconstruction of cellular distribution. *J. Neurosci.* 8: 1776- 1788.

**German D. C., Manaye K.F., White C.L., Woodward D.J., McIntire D.D., Smith W.K., Kalaria R.N. and Mann D.M.** (1992) Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann. Neurol.* 32: 667- 676.

**German D.C. and Manaye K.F.** (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9 and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *The journal of comparative neurology.* 331: 297-309.

**Gibb W.R.** (1988) The neuropathology of parkinsonian disorders. *Parkinson's Disease and Movement Disorders.* 8:205-223.

**Gibb W.R., Luthert P.J. and Marsden C.D.** (1989) Corticobasal degeneration. *Brain.* 112: 1171- 1192.

**Giovannini M.G., Scali C., Prosperi C., Bellucci A., Vannucchi M.G., Rosi S., Pepeu G. and Casamenti F.** (2002). Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiology of Disease.* 11: 257-274.

**Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roues P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M. and Owen M.** (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349: 704-706.

**Goedert M.** (1996) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 17(777): 121-131.

**Goldman-Rakic P.S. and Schwartz M.L.** (1982) Interdigitation of contralateral and ipsilateral columnar projections to frontal association cortex in primates. *Science.* 216: 755-757.

**Gomez-Ramos A., Diaz-Hernandez M., Rubio A., Miras-Portugal M.T. and Avila J.** (2008) Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 37: 673-681.

**Gomez-Ramos A., Diaz-Hernandez M., Rubio A., Diaz-Hernandez J.I., Miras-Portugal M.T. and Avila J.** (2009) Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19:708-717.

**Gong C.X., Liu F., Grundke-Iqbal I. and Iqbal K.** (2005) Post- translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 112: 813-838.

**Gouras G.K., Tampellini D., Takahashi R.H. and Capetillo-Zarate E.** (2010) Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 119: 523-541.

**Greenamyre J.T.** (1986) The role of glutamate in neurotransmission and neurological disease. *Arch. Neurol.* 43: 1058-1063.

**Grudzien A., Shaw P., Weintraub S., Bigio E., Mash D.C. and Mesulam M.M.** (2007) Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 28(3): 327-335.

**Haass C., Koo E.H., Mellon A., Hung A.Y. and Selkoe D.J.** (1992) Targeting of cell surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357(6378): 500-3.

**Haass C. and Selkoe D.J.** (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid[beta]- peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 101-112.

**Haglund L., Swanson L.W., Köhler C.** (1984) The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *Journal of Comparative Neurology.* 229(2): 171-185.

**Hakim A.M. and Mathieson G.** (1979) Dementia in Parkinson disease: a neuropathologic study. *Neurology* 29: 1209-1214.

**Halliday G.M. and Tork I.** (1986) Comparative anatomy of the ventromedial mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human. *The journal of comparative neurobiology.* 252: 423-445.

**Halliday G.M., Blumbergs P.C., Cotton R.G., Blessing W.W. and Geffen L.B.** (1990) Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Research.* 510: 104-107.

**Hardy J. and Allsop D.** (1991) Amyloid deposition as the central event in the etiology of Alzheimer's disease. *TiPS.* 12: 383-388.

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

**Harkany T., O'Mahony S., Kelly J.P., Soòs K., Toro I., Penke B., Luiten P.G., Nyakas C., Gulya K. and Leonard B.E.** (1998) Beta-amyloid (Phe(S03H)24)25-35 in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation. *Behav. Brain Research.* 90(2): 133-145.

**Hartmann T., Bieger S.C., Bruhl B., Tienari P.J., Ida N. Allsop D., Roberts G.W., Masters C.L., Dotti C.G., Unsicker K. and Beyreuther K.** (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A-beta 40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* 3: 1016-1020.

**Hasselmo M.E.** (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16(6): 710-5.

**Heckers S., Ohtake T., Wiley R.G., Lappi D.A., Geula C. and Mesulam M.M.** (1994) Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by an immunotoxin against the p75 NGF receptor. *J. Neurosci.* 14(3): 1271-1289.

**Hedreen J.C., Bacon S.J. and Price D.L.** (1985) A modified histochemical technique to visualize acetylcholinesterase-containing axons. *J. Histochem. Cytochem.* 33(2): 134-40.

**Heneka M.T., Galea E., Gavrilyuk V., DumitrescuOzimek L., Daeschner J., O'Banion M.K., Weinberg G., Klockgether T. and Feinstein D.L.** (2002) Noradrenergic depletion potentiates beta-amyloid-induced cortical inflammation: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22 (7): 2434-2442.

**Heneka M.T., Gavrilyuk V., Landreth G.E., O'Banion M.K., Weinberg G. and Feinstein D.L.** (2003) Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on IkappaB and HSP70 expression. *J. Neurochem.* 85(2): 387-398.

**Heneka M.T., Ramanathan M., Jacobs A.H., DumitrescuOzimek L., BilkeiGorzo A., Debeir T., Sastre M., Galdiks N., Zimmer A., Hoehn M., Heiss W.D., Klockgether T. and Staufenbiel M.** (2006) Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J. Neurosci.* 26(5): 1343-1354.

**Herkenham M.** (1978) The connections of the nucleus reuniens thalami: Evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *Journal of Comparative Neurology.* 177 (4): 589-609.

**Herman A.M., Khandelwal P.J., Stanczyk B.B., Rebeck G.W. and Moussa C.E.H.** (2011) B-amyloid triggers ALS-associated TDP-43 pathology in AD models. *Brain Research.* 1386: 191-199.

**Hobson J.A., McCarley R.W. and Wyzinski P.W.** (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science.* 189(4196): 55-58.

**Hohmann C.F. and Ebner F.F.** (1985) Development of cholinergic markers in mouse forebrain. I. Choline acetyltransferase enzyme activity and acetylcholinesterase histochemistry. *Brain Res.* 355(2): 225-241.

**Holtzman D.M., Morris J.C. and Goate A.M.** (2011) Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci. Transl. Med.* 3 (77): 77.

**Honson N.S. and Kuret J.** (2008) Tau aggregation and toxicity in tauopathic neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 14(4): 417-422.

**Hoogendijk W.J., Pool C.W., Troost D., van Zwieten E. and Swaab D.F.** (1995) Image analyser-assisted morphometry of the locus coeruleus in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 118(1): 131-143.

**Hooper C., Killick R. and Lovestone S.** (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry.* 104: 1433-1439.

**Hu W.T., Josephs K.A. and Knopman D.S.** (2008) Temporal lobar predominance of TDP-43 neuronal cytoplasmic inclusion in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 116: 215-220.

**Hultborn H. and Kiehn O.** (1992) Neuromodulation of vertebrate motor neuron membrane properties. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2(6): 770-775.

**Iqbal K., Liu F., Gong C-X, Alonso A. and Grundke-Iqbal I.** (2009) Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 118 (1): 53-69.

**Ito K., Nagano-Saito A. and Kato T.** (2002) Striatal and extrastriatal dysfunction in Parkinson's disease with dementia: a 6-[18F]fluoro-L-dopa PET study. *Brain: a journal of neurology.* 125: 1358-1365.

**Itoh A., Nitta A., Nadai M., Nishimura K., Hirose M., Hasegawa T., Nabeshima T.** (1996) Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in beta-amyloid protein-infused rats. *J. Neurochem.* 66(3): 1113-1117.

**Iwai A., Masliah E., Sundsmo M.P., DeTeresa, R., Mallory M., Salmon D.P. and Saitoh T.** (1996) The synaptic protein NACP is abnormally expressed during the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 720: 230-234.

**Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N. and Ihara Y.** (1994) Visualization of A-beta42(43) and A-beta40 in senile plaques with end-specific A-beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A-beta42(43). *Neuron.* 13: 45-53.

**Izquierdo L.A., Barros D.M., da Costa J.C., Furini C., Zinn C., Cammarota M., Bevilaqua L.R. and Izquierdo I.** (2007) A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88: 160-166.

**Jackson-Lewis V., Blesa J. and Przedborski S** (2012) Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 1: 183-185.

**Jarrett J.T., Berger E.P. and Lansbury P.T.** (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 32: 4693-4697.

**Jellinger K.A.** (2009). Alzheimer's disease: a challenge for modern neuropathology. *Acta Neuropathol.* 118: 1-3.

**Jokinen P., Bruck A., Aalto S., Forsback S., Parkkola R. and Rinne J.O.** (2009) Impaired cognitive performance in Parkinson's disease is related to caudate dopaminergic hypofunction and hippocampal atrophy. *Parkinsonism and related disorders.* 15: 88-93.

**Jones B.E., Halaris A.E., McIlhany M. and Moore R.Y.** (1977) Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. I. Axonal transport in central noradrenaline neurons. *Brain Res.* 127(1): 1-21.

**Jones S.L. and Gebhart G.F.** (1986) Characterization of coeruleospinal inhibition of the nociceptive tail-flick reflex in the rat: mediation by spinal alpha 2-adrenoceptors. *Brain Res.* 364(2): 315-330.

**Kalinin S., Gavrilyuk V., Polak P.E., Vasser R., Zhao J., Heneka M.T. and Feinstein D.L.** (2007) Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 28(8): 1206-1214.

**Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., Seabrook G., Borchelt D., Iwatsubo T., Sisodia S. and Malinow R.** (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron*. 37: 925-937.

**Kar S., Slowikowski S.P.M, Westaway D. and Mount H.T.J.** (2004) Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neuroscience*. 29(6): 427-441.

**Katzenschlager R. and Lees A.J.** (2002) Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. *Journal of Neurology*. 249(2): 19-24.

**Kemp A. and ManahanVaughan D.** (2008) The hippocampal CA1 region and dentate gyrus differentiate between environmental and spatial feature encoding through long-term depression. *Cereb. Cortex*. 18(4): 968-977.

**Kim S.U. and De Vellis J.** (2009) Stem cell-based therapy in neurological diseases: a review. *J. Neurosci Res*. 87(10): 2183-2200.

**Kirk R.C., White K.G. and McNaughton N.** (1988) Low dose scopolamine affects discriminability but not rate of forgetting in delayed conditional discrimination. *Psychopharmacology (Berl)*. 96(4): 541-546.

**Kirkitadze M.D. and Kowalska A.** (2005) Molecular mechanisms initiating amyloid beta-fibril formation in Alzheimer's disease. *Acta Biochimica Polonica*. 52 (2): 417-423.

**Kisilevsky R., Szarek W.A., Ancsin J., Vohra R., Li Z. and Marone S.** (2004) Novel glycosaminoglycan precursors as anti-amyloid agents: Part IV. *J. Mol. Neurosci*. 24 (1): 167-172.

**Koh S. and Loy R.** (1989) Localization and development of nerve growth factor sensitive rat basal forebrain neurons and their afferent projections to hippocampus and neocortex. *J. Neurosci*. 9(9): 2999-3018.

**Kokubo Y., Kuzuhara S. and Narita Y.** (2000) Geographical distribution of amyotrophic lateral sclerosis with neurofibrillary tangles in the Kii Peninsula of Japan. *J. Neurol*. 247: 850-852.

**Korcyn A.D.** (2001) Dementia in Parkinson's disease. *J. Neurol*. 248 (3): 1-4.

**Kosik K.S., Joachim C.L. and Selkoe D.J.** (1986) Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83: 4044-4048.

**Krystal J.H. and Neumeister A.** (2009) Noradrenergic and serotonergic mechanisms in the neurobiology of posttraumatic stress disorder and resilience. *Brain Res*. 1293: 13-23.

**Kumar S., Rezaei-Ghaleh N., Terwel D., Thal D.R., Richard M., Hoch M., McDonald J.M., Wullner U., Glebov K., Heneka M.T., Walsh D.M., Zweckstetter M. and Walter J.** (2011) Extracellular phosphorylation of the amyloid [beta]-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J*. 30: 2255-2265.

**Kuo Y.M., Webster S., Emmerling M.R., De Lima N. and Roher A.E.** (1998) Irreversible dimerization/tetramerization and post-translational modifications inhibit proteolytic degradation of A-beta peptides of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1406: 291-298.

**Lacor P.N., Buniel M.C., Furlow P.W., Clemente A.S., Velasco P.T., Wood M., Viola K.L. and Klein W.L.** (2007) Beta-amyloid oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 27:796-807.

**Lagier-Tourenne C. and Cleveland D.W.** (2009) Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell.* 136(6): 1001-1004.

**Lange K.W., Wells F.R., Jenner P. and Marsden C.D.** (1993) Altered muscarinic and nicotinic receptor densities in cortical and subcortical brain regions in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 60: 197-203.

**Langston J.W. and Ballard P.** (1984) Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 11: 160-165.

**Langston J.W.** (1987) MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *Eur. Neurol.* 26(1): 2-10.

**Langston J.W.** (1998) Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate. *Ann. Neurol.* 44: 45-52.

**Larson E.B., Kukull W.A. and Katzman R.L.** (1992) Cognitive impairment dementia and Alzheimer's disease. *Annu Rev Public Health.* 13:431-439

**Lauder J.M. and Bloom F.E.** (1974) Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. Comp. Neurol.* 155(4): 469-481.

**Lauder J.M.** (1988) Neurotransmitters as morphogens. *Prog. Brain Res.* 73: 365-387.

**Lauder J.M.** (1993) Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trend in Neuroscience.* 16: 233-240.

**Leanza G., Nilsson O.G., Wiley R.G. and Björklund A.** (1995) Selective lesioning of the basal forebrain cholinergic system by intraventricular 192 IgG-saporin: behavioural, biochemical and stereological studies in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7(2): 329-343.

**Leanza G., Nilsson O.G., Nikkhah G., Wiley R.G. and Björklund A.** (1996) Effects of neonatal lesions of the basal forebrain cholinergic system by 192 immunoglobulin G-saporin: biochemical, behavioural and morphological characterization. *Neuroscience.* 74(1): 119-141.

**Leanza G.** (1998) Chronic elevation of amyloid precursor protein expression in the neocortex and hippocampus of rats with the selective cholinergic lesion. *Neuroscience letters.* 257 (1): 53-56

**Lesege S. and Brice A.** (2009) Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* 18 (1): 48-59.



**Leverenz J. and Sumi S.M.** (1986) Parkinson's disease in patients with Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 43: 662-664.

**Levin E.D.** (2006) Neurotransmitter interactions and cognitive function. *Basel: Birkhauser.*

**Levitt P. and Moore R.Y.** (1979) Development of the noradrenergic innervation of neocortex. *Brain Res.* 162(2): 243-259.

**Lewis P.R. and Shute C.C.** (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain.* 90(3): 521-540.

**Lewis D.I. and Coote J.H.** (1990) Excitation and inhibition of rat sympathetic preganglionic neurones by catecholamines. *Brain Res.* 530(2): 229-234.

**Lewis J., McGowan E., Rockwood J., Melrose H., Nacharaju P., Van Slegtenhorst M., Gwinn-Hardy K., Paul Murphy M., Baker M., Yu X., Duff K., Hardy J., Corral A., Lin W.L., Yen S.H., Dickson D.W., Davies P. and Hutton M.** (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat. Genet.* 25(4): 402-405.

**Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S.H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M. and McGowan E.** (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 293(5534):1487-1491.

**Li S., Mallory M., Alford M., Tanaka S. and Masliah E.** (1997) Glutamate transporter alterations in Alzheimer's disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56: 901-911.

**Li S.W., Lin T.S., Minter S. and Burke W.J.** (2001) 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and hydrogen peroxide generate a hydroxyl radical: possible role in Parkinson's disease pathogenesis. *Molecular Brain Research.* 93: 1-7.

**Lin L., LeBlanc C.J., Dacon T.W. and Isacson O.** (1998) Chronic cognitive deficits and amyloid precursor protein elevation after selective immunotoxin lesions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroreport.* 9(3): 547-552

**Lindvall O., Bjorklund A., Moore R. Y. and Stenevi U.** (1974) Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Research.* 81: 325-331.

**Lippa C.F., Rosso A.L. and Stutzbach L.D.** (2009) Transactive response DNA-binding protein 43 burden in familial Alzheimer's disease and Down syndrome. *Arch. Neurol.* 66: 1483-1488.

**Loizou L.A. and Salt P.** (1970) Regional changes in monoamines of the rat brain during postnatal development. *Brain Res.* 20(3): 467-470.

**Loughlin S.E., Foote S.L. and Fallon J.H.** (1982) Locus coeruleus projections to cortex: topography, morphology and collateralization. *Brain Res. Bull.* 9(6): 287-294.

**Lu Q. and Wood J.G.** (1993) Functional studies of Alzheimer's disease tau protein. *The Journal of Neuroscience.* 13 (2): 508-515.

**Lu M.T., Preston J.B. and Strick P.L.** (1994) Interconnections between the prefrontal cortex and the premotor areas in the frontal lobe. *J Comp Neurol.* 341: 375–392.

**Maksimovich I.V.** (2012) Vascular factors in Alzheimer's disease. *Health.* 4: 735-742.

**Malenka R.C.** (1994) Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell.* 78: 535-538.

**Mandelkow E.M. and Mandelkow E.** (2012) Biochemistry and cell Biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold. Spring. Hard. Perspect. Med.* 2: a006247.

**Mann D.M., Yates P.O. and Hawkes J.** (1982) The noradrenergic system in Alzheimer and multi-infarct dementias. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 45: 113–119.

**Mann D.M.A.** (1983) The locus coeruleus and its possible role in ageing and degenerative disease of the human central nervous system. *Mech. Ageing Dev.* 23: 73– 94.

**Mann D.M.A., Yates P.O. and Hawkes J.** (1983) The pathology of the human *locus ceruleus*. *Clin. Neuropathol.* 2: 1 –7.

**Mann D.M.A., Yates P.O. and Marcyniuk B.** (1985) Correlation between senile plaque and neurofibrillary tangle counts in cerebral cortex and neuronal counts in cortex and subcortical structures in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 56: 51-55.

**Mann D.M.A., Yates P.O. and Marcyniuk B.** (1987) Dopaminergic neurotransmitter systems in Alzheimer's disease and in Down's Syndrome at middle age. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.* 50: 341-344.

**Maragos W.F., Greenamyre F.T. and Penney J.B.** (1987) Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *TINS.* 10: 65-68.

**Marcoux J. and Rossignol S.** (2000) Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments. *J. Neurosci.* 20(22): 8577-8585.

**Marien M.R., Colpaert F.C. and Rosenquist A.C.** (2004) Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res. Rev.* 45 (1): 38-78.

**Martin, L., Latypova X. and Terro F.** (2011) Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 58: 458–471.

**Masliah E., Alford M., DeTeresa R., Mallory M. and Hansen L.** (1996a) Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 40: 759-766.

**Masliah E., Iwai A., Mallory M., Ueda K. and Saitoh T.** (1996b) Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 148: 201–210.

**Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L. and Beyreuther K.** (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4245-4249.

**Mattay V.S., Tessitore A., Callicott J.H., Bertolino A., Goldberg T.E., Chase T.N., Hyde T.M. and Weinberger D.R.** (2002) Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Annals of Neurology.* 51: 156-164.

**Mattila P.M., Rinne J.O., Helenius H., Dickson D.W. and Roytta M.** (2000) Alpha-synuclein-immunoreactive cortical Lewy bodies are associated with cognitive impairment in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica.* 100: 285-290.

**Mattila P.M., Roytta M., Lonnberg P., Marjamaki P., Helenius H. and Rinne J.O.** (2001) Choline acetyltransferase activity and striatal dopamine receptors in Parkinson's disease in relation to cognitive impairment. *Acta Neuropatol.* 102: 160-166.

**Mattson M.P., Barger S.W., Cheng B., Lieberburg I., Smith-Swintosky V.L. and Rydel R.E.** (1993) Beta-amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences.* 16 (10): 409-414.

**Mavridis M., Degryse A.D., Lategan A., Marien M. and Colpaert F.** (1991) Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 41: 507-523.

**McNaught K.S., Bjorklund L.M., Belizaire R., Isacson O., Jenner P. and Olanow C.W.** (2002) Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuro-Report.* 13: 1437-1441.

**McRitchie D.A., Cartwright H.R. and Halliday G.M.** (1997) Specific A10 dopaminergic nuclei in the midbrain degenerate in Parkinson's disease. *Experimental Neurology.* 144: 202-213.

**Mesulam M.M., Mufson E.J., Levey A.I. and Wainer B.H.** (1983) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 214(2): 170-197.

**Meunier J., Ieni J. and Maurice T.** (2006) The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid-beta 25-35 peptide induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 149(8): 998-1012.

**Miller E.K.** (2000) The prefrontal cortex and cognitive control. *Nat Rev Neurosci.* 1: 59-65.

**Milner T.A., Loy R. and Amaral D.G.** (1983) An anatomical study of the development of the septo-hippocampal projection in the rat. *Brain Res.* 284(3): 343-371.

**Milstein J.A., Lehmann O., Theobald D.E.H., Dalley J.W. and Robbins T.W.** (2007) Selective depletion of cortical noradrenaline by anti-dopamine beta-hydroxylase-saporin impairs attentional function and enhances the effects of guanfacine in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 190(1): 51-63.

**Milton N.G.N.** (2001) Phosphorylation of amyloid-[beta] at the serine 26 residue by human cdc2 kinase. *Neuro Report*. 12: 3839–3844.

**Mitchell A.J.** (2009) CSF phosphorylated tau in the diagnosis and prognosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a meta-analysis of 51 studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 80: 966-975.

**Miyamoto M., Shintani M., Nagaoka A. and Nagawa Y.** (1985) Lesioning of the rat basal forebrain leads to memory impairments in passive and active avoidance tasks. *Brain Res*. 328(1): 97-104.

**Miyamoto M., Kato J., Narumi S. and Nagaoka A.** (1987) Characteristics of memory impairment following lesioning of the basal forebrain and medial septal nucleus in rats. *Brain Res*. 419(1-2): 19-31.

**Mohandas E., Rajmohan V. and Raghunath B.** (2009) Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian journal of Psychiatry*. 51 (1): 55-61.

**Mori H., Ishii K., Tomiyama T., Furiya Y., Sahara N., Asano S., Endo N., Shirasawa T. and Takio K.** (1994) Racemization: its biological significance on neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Tohoku J. Exp. Med*. 174: 251–262.

**Morris R.** (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*. 11(1): 47-60.

**Moser E.I.** (2011) The multi-laned hippocampus. *Nature Neuroscience*. 14: 407–408.

**Mosharov E.V., Larsen K.E. and Kanter E.** (2009) Interplay between cytosolic dopamine, calcium and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*. 62: 218-229.

**Murphy D.E. and Boast C.A.** (1985) Searching for models of Alzheimer's disease: a comparison of four amnesic treatments in two behavioral tasks. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 444: 450-452.

**Murrin L.C., Sanders J.D. and Bylund D.B.** (2007) Comparison of the maturation of the adrenergic and serotonergic neurotransmitter systems in the brain: implications for differential drug effects on juveniles and adults. *Biochem. Pharmacol*. 73(8): 1225-1236.

**Muslimovic D., Post B., Speelman J.D. and Schmand B.** (2005) Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. *Neurology*. 65: 1239-1245.

**Muthuraju S., Maiti P., Solanki P., Sharma A.K., Amitabh, Singh S.B., Prasad D. and Ilavazhagan G.** (2009) Acetylcholinesterase inhibitors enhance cognitive functions in rats following hypobaric hypoxia. *Behav. Brain Res*. 203(1): 1-14.

**Nabeshima T.** (1993) Behavioral aspects of cholinergic transmission: role of basal forebrain cholinergic system in learning and memory. *Prog. Brain Res*. 98: 405-411.

**Nagatsu T and Levitt M.** (1964) Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J. Biol. Chem*. 239: 2910-2917.

**Nair-Roberts R.G., Chatelain-Badie S.D., Benson E., White-Cooper H., Bolam J.P. and Ungless M.A.** (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*. 152: 1024-1031.

**Nakamura S., Murayama N., Takafumi N., Annoura H. and Ohno T.** (2001) Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta 1-42-amyloid peptide. *Brain Research*. 912: 128-136.

**Nakano I. and Hirano A.** (1984) Parkinson's disease: neuron loss in the nucleus basalis without concomitant Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 15: 415-418.

**Naumann T., Linke R. and Frotscher M.** (1992) Fine structure of rat septohippocampal neurons: I. Identification of septohippocampal projection neurons by retrograde tracing combined with electron microscopic immunocytochemistry and intracellular staining. *Journal of Comparative Neurology*. 325 (2): 207-218.

**Netto C.A., Valente J.T., Borges Sobrinho J.B., Lasevitz J. and Tomaz C.A.** (1991) Reversal of retrieval impairment caused by retroactive interference on a two-way active avoidance task in rats. *Behav. Neural. Biol.* 55(1): 114-122.

**Neumann M.** (2009) Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Int J Mol Sci*. 10: 232-246.

**Nieuwenhuys R., Voogd J. and van Huijzen C.** (2008) The human central nervous system. 4th edition, Berlin: Springer.

**Nilsson O.G., Shapiro M.L., Gage F.H., Olton D.S. and Björklund A.** (1987) Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Exp. Brain Res*. 67(1): 195-215.

**Nilsson O.G., Leanza G., Rosenblad C., Lappi D.A., Wiley R.G. and Björklund A.** (1992) Spatial learning impairments in rats with selective immunolesion of the forebrain cholinergic system. *Neuroreport*. 3(11): 1005-1008.

**Nimmrich V., Grimm C., Draguhn A., Barghorn S., Lehmann A., Schoemaker H., Hillen H., Gross G., Ebert U. and Bruehl C.** (2008) Beta-amyloid oligomers (A-beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J. Neurosci*. 28: 788-797.

**Nishimoto Y., Ito D., Yagi T., Nihei Y., Tsunoda Y. and Suzuki N.** (2010) Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA binding protein-43. *J. Biol. Chem*. 285(1): 608-619.

**Nitsch R.M., Slack B.E., Wurtman R.J. and Growdon J.H.** (1992) Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*. 258: 304-307.

**Nygren L.G. and Olson L.** (1977) A new major projection from locus coeruleus: the main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. *Brain Res*. 132(1): 85-93.

**Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kaye R., Metherate R., Mattson M.P., Akbari Y. and LaFerla F.M.** (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39(3): 409-421.

**Orrell R.W., King A.W., Hilton D.A., Campbell M.J., Lane R.J. and de Belloche J.S.** (1995) Familial amyotrophic lateral sclerosis with a point mutation of SOD-1: intrafamilial heterogeneity of disease duration associated with neurofibrillary tangles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 59: 266-270.

**Oueslati A., Fournier M. and Lashuel H.A.** (2010) Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alfa-synuclein: Implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Progress in Brain Research. Elsevier*. 7: 115-145.

**Page K.J. and Sofroniew M.V.** (1996) The ascending basal forebrain cholinergic system. *Prog. Brain. Res.* 107: 513-522.

**Pàkàski M. and Kàlmàn J.** (2008) Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 53 (5): 103-111.

**Palmer A.M. and Gershon S.** (1990) Is the neuronal basis of Alzheimer's disease cholinergic or glutamatergic? *FASEB J.* 4: 2745-2752.

**Panda D., Goode B.L., Feinstein S.C. and Wilson L.** (1995) Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry*. 34: 11117-11127.

**Pappas B.A., Davidson C.M., Fortin T., Nallathamby S., Park G.A., Mohr E. and Wiley R.G.** (1996) 192 IgG-saporin lesion of basal forebrain cholinergic neurons in neonatal rats. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 96(1-2): 52-61.

**Pappas B.A., Nguyen T., Brownlee B., Tanasolu D., Fortin T. and Sherren N.** (2000) Ectopic noradrenergic hyperinnervation does not functionally compensate for neonatal acetylcholine lesion. *Brain Res.* 867(1-2): 90-99

**Pasqual-Sedano B., Kulisevsky J., Barbanoj M., Garcia-Sanchez C., Campolongo A., Gironell A., Pagonabarraga J. and Gich I.** (2008) Levodopa and executive performance in Parkinson's disease: a randomized study. *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS*. 14: 832-841.

**Paxinos G. and Watson C.** (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. 4 ed. *Academic Press: San Diego, CA, USA.*

**Pendleton R.G., Rasheed A., Roychowdhury R. and Hillman R.** (1998) A new role for catecholamines: ontogenesis. *Drug development research*. 50: 142-146.

**Perez V., Marin C., Rubio A., Aguilar E., Barbanoj M. and Kulisevsky J.** (2009) Effect of the additional noradrenergic neurodegeneration to 6-OHDA-lesioned rats in levodopa-induced dyskinesias and in cognitive disturbances *J. Neural Transm.* 116: 1257-1266.

**Perl D.P., Olanow C.W. and Calne D.** (1998) Alzheimer's disease and Parkinson's disease: distinct entities or extremes of a spectrum of neurodegeneration? *Ann. Neurol.* 44 (3.1): 19–31.

**Perry E.K., Gibson P.H., Blessed G., Perry R.H. and Tomlinson B.E.** (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* 34: 247-265.

**Perry E.K.** (1980) The cholinergic system in old age and Alzheimer's disease. *Age Ageing.* 9: 1–8.

**Perry E.K., Curtis M., Dick D.J., Candy J.M., Atack J.R., Bloxham C.A.** (1985) Cholinergic correlates of cognitive impairment in Parkinson's disease: comparisons with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 48: 413–421.

**Pifl C., Schingnitz G. and Hornykiewicz O.** (1991) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience.* 44: 591–605.

**Pike C.J., Walencewicz A.J., Glabe C.G. and Cotman C.W.** (1991) *In vitro* aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain. Res.* 563(1-2): 311-314.

**Pike C.J., Overman M.J. and Cotman C.W.** (1995) Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 270: 23895–23898.

**Pioro E.P. and Cuello A.C.** (1988) Purkinje cells of adult rat cerebellum express nerve growth factor receptor immunoreactivity: light microscopic observations. *Brain Res.* 455(1): 182-186.

**Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., DiIorio G., Golbe L.I. and Nussbaum R.L.** (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276: 2045–2047.

**Portelius E., Bogdanovi N., Gustavsson M.K., Volkman I., Brinkmalm G., Zetterberg H., Winblad B. and Blennow K.** (2010) Mass spectrometric characterization of brain amyloid-beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 120: 185–193.

**Power A.E., Vazdarjanova A. and McGaugh J.L.** (2003) Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80(3):178-193.

**Priller C., Bauer T., Mitteregger G., Krebs B., Kretschmar H.A. and Herms J.** (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 26: 7212-7221.

**Raisman G.** (1966) The connexions of the septum. *Brain.* 89(2): 317-348.

**Reinikainen K.J., Soininen H. and Riekkinen P.J.** (1990) Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: implications to diagnostics and therapy. *J. Neurosci. Res.* 27(4): 576-586.

**Restani P., Corsini E., Galimberti R. and Galli C.L.** (1990) Post-natal ontogenesis of dopaminergic and serotonergic systems in rat caudate nucleus. *Pharmacol. Res.* 22: 343-350.

**Rho J.M. and Storey T.W.** (2001) Molecular ontogeny of major neurotransmitter receptor systems in the mammalian central nervous system: norepinephrine, dopamine, serotonin, acetylcholine, and glycine. *J. Child. Neurol.* 16(4): 271-280.

**Ricceri L., Hohmann C. and Berger-Sweeney J.** (2002) Early neonatal 192 IgG saporin induces learning impairments and disrupts cortical morphogenesis in rats. *Brain Res.* 954(2): 160-172.

**Riekkinen M., Kejonen K., Jakala P., Soininen H., and Riekkinen P.J.** (1998) Reduction of noradrenaline impairs attention and dopamine depletion slows responses in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1429-1435.

**Rogers J.D., Brogan D. and Mirra S.S.** (1985) The nucleus basalis of Meynert in neurological disease: a quantitative morphological study. *Ann Neurol.* 17: 163-170.

**Rogers J.T., Leiter L.M., McPhee, J., Cahill C.T., Zhan S.S., Potter H. and Nilsson L.N.G.** (1998) Translation of the Alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *The journal of biological chemistry.* 274: 6421-6431.

**Ruberg M., Ploska A., Javoy-Agid F. and Agid Y.** (1982) Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Res.* 232: 129-139.

**Ruberg M., Rieger F., Villageois A., Bonnet A.M. and Agid Y.** (1986) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. *Brain Res.* 362: 83-91.

**Sabban E.L., Greene L.A. and Goldstein M.** (1983) Mechanism of biosynthesis of soluble and membrane-bound forms of dopamine beta-hydroxylase in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 258(12): 7812-7818.

**Saigal R.P., Karamanlidis A.N., Voogd J., Michaloudi H. and Mangana O.** (1980) Cerebellar afferents from motor nuclei of cranial nerves, the nucleus of the solitary tract, and nuclei coeruleus and parabrachialis in sheep, demonstrated with retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 197(1): 200-206.

**Samuels E.R. and Szabadi E.** (2008) Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr. Neuropharmacol.* 6(3): 235-253.

**Sanberg P.R.** (1980) Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. *Nature.* 284: 472-473.

**Sanders J.D., Happe H.K., Bylund D.B. and Murrin L.C.** (2008) Differential effects of neonatal norepinephrine lesions on immediate early gene expression in developing and adult rat brain. *Neuroscience.* 157(4): 821-832.



**Sara S.J.** (1985) Noradrenergic modulation of selective attention: its role in memory retrieval. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 444: 178-193.

**Sara S.J.** (1998) Learning by neurones: role of attention, reinforcement and behaviour. *CR. Acad. Sci.* 321(3): 193-198.

**Sara S.J.** (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10(3): 211-223.

**Sarter M. and Bruno J.P.** (2000) Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience.* 95(4): 933-952.

**Scarpini E., Scheltens P. and Feldman H.** (2003) Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol* 2 (9): 539-547.

**Schober A.** (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell. Tissue Res.* 318: 215-224

**Seguela P., Watkins K.C., Geffard M. and Descarries L.** (1990) Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience.* 35(2): 249-264.

**Selkoe D.J.** (1994) Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53(5): 438-47.

**Selkoe D.J.** (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 298: 789-791.

**Semba K. and Fibiger H.C.** (1988) Time of origin of cholinergic neurons in the rat basal forebrain. *J. Comp. Neurol.* 269(1): 87-95.

**Seubert P., Olterssdorf T., Lee M.G., Barbour R., Blomquist C., Davis D.L., Bryant K., Fritz L.C., Galasko D., Thal L.J., Liberburg I. and Shenk D.B.** (1993) Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature.* 361(6409): 260-263.

**Silver M.A. and Jacobowitz D.M.** (1979) Specific uptake and retrograde flow of antibody to dopamine-beta-hydroxylase by central nervous system noradrenergic neurons in vivo. *Brain. Res.* 167(1): 65-75.

**Silverman P.B.** (1993) On-off effects of dopamine receptor agonists in the hemiparkinsonian rat. *Eur. J. Pharmacol.* 242: 31-36.

**Simard A.R., Soulet D., Gowing G., Julien J.P. and Rivest S.** (2006) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron.* 49: 489-502.

**Sisodia S.S., Koo E.H., Beyreuther K., Unterbeck A. and Price D.L.** (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science.* 248 (4954): 492-495.

**Smith Y., Wichmann T., Factor S.A. and DeLong M.R.** (2012) Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 37: 213-246.

**Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R. and Goedert M.** (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 388: 839-840.

**Stirpe F., Barbieri L., Battelli M.G., Soria M. and Lappi D.A.** (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology (NY)*. 10(4): 405-412.

**Strong M.J., Volkening K., Hammond R., Yang W, Strong W., Leystra-Lantz C. and Shoosmith C.** (2007) TDP-43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol. Cell. Neurosci*. 35: 320-327.

**Sugiyama H., Hainfellner J.A., Schmid-Siegel B. and Budka H.** (1993) Neuroaxonal dystrophy combined with diffuse Lewy body disease in a young adult. *Clin. Neuropathol*. 12: 147-152.

**Tagliavini F., Pilleri G., Bouras C. and Constantinidis J.** (1984) The basal nucleus of Meynert in idiopathic Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand*. 70: 20-28.

**Taylor J.P., Hardy J. and Fischbeck K.H.** (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*. 296: 1991-1995.

**Thomas L.B., Book A.A. and Schweitzer J.B.** (1991) Immunohistochemical detection of a monoclonal antibody directed against the NGF receptor in basal forebrain neurons following intraventricular injection. *J. Neurosci. Methods*. 37(1): 37-45.

**Thor K.B., Kirby M. and Viktrup L.** (2007) Serotonin and noradrenaline involvement in urinary incontinence, depression and pain: scientific basis for overlapping clinical efficacy from a single drug, duloxetine. *Int. J. Clin. Pract*. 61(8): 1349-1355.

**Tokutake T., Kasuga K., Yajima R., Sekine Y., Tezuka T., Nishizawa M. and Ikeuchi T.** (2012). Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway. *J. Biol. Chem*. 287: 35222-35233.

**Tomiyama T., Asano S., Furiya Y., Shirasawa T., Endo N. and Mori H.** (1994) Racemization of Asp23 residue affects the aggregation properties of Alzheimer amyloid beta protein analogues. *J. Biol. Chem*. 269: 10205-10208.

**Torres E.M., Perry T.A., Blockland A., Wilkinson L.S., Wiley R.G., Lappi D.A. and Dunnet S.B.** (1994) Behavioural, histochemical and biochemical consequences of selective immunolesions in discrete regions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroscience*. 63(1): 95-122.

**Tran M.H., Yamada K. and Nabeshima T.** (2002) Amyloid-beta peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview. *Peptides*. 23: 1271-1283.

**Tremblay C., St-Amour I., Schneider J., Bennet D.A. and Calon F.** (2011) Accumulation of TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) in mild cognitive impairment and alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 70: 788-798.

**Tronel S., Feenstra M.G. and Sara S.J.** (2004) Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learn. Mem.* 11(4): 453-458.

**Tulving E. and Thompson D.M.** (1973) Encoding specificity and retrieval processes in episodic memory. *Psychological Review.* 80: 352-373.

**Ungerstedt U.** (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopa-mine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 367: 69-93.

**Uylings H.B. and van Eden C.G.** (1990) Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res.* 85: 31-62.

**van Marum R.J.** (2008) Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22(3): 265-274.

**Victoroff J., Zarow C., Mack W.J., Hsu E. and Chui H.C.** (1996) Physical aggression is associated with preservation of substantia nigra pars compacta in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 53: 428-434.

**Viscomi M. and D'Amelio M.** (2012) The "Janus-Faced Role" of autophagy in neuronal sickness: focus on neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 46: 513-521.

**von Campenhausen S., Bornschein B. and Wick R.** (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology.* 15: 473-490.

**Voorn P., Kalsbeek A., Jorritsma-Byham B. and Groenewegen H.J.** (1988) The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience.* 25: 857-887.

**Voss K. and Gamblin T.C.** (2009) GSK3-beta phosphorylation of functionally distinct tau isoforms has differential, but mild effects. *Molecular Neurodegeneration.* 4: 18

**Waite J.J., Chen A.D., Wardlow M.L., Wiley R.G., Lappi D.A. and Thal L.J.** (1995) 192 immunoglobulin G-saporin produces graded behavioral and biochemical changes accompanying the loss of cholinergic neurons of the basal forebrain and cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience.* 65(2): 463-476.

**Walker L.C. and LeVine Iii H.** (2000) The cerebral proteopathies. *Neurobiol. Aging.* 21: 559-561.

**Wang Z., Chang L., Klein W.L., Thatcher G.R. and Venton D.L.** (2004) Per-6-substituted-per-6-deoxy beta-cyclodextrins inhibit the formation of beta-amyloid peptide derived soluble oligomers. *J. Med. Chem.* 47(13): 3329-3333.

**Wang I.F., Wu L.S. and Shen C.K.** (2008) TDP-43: an emerging new player in neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* 14: 479-485.

**Waring S.C. and Rosenberg R.N.** (2008) Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 65: 329-334.

**Watson W.J. and Seiden H.S.** (1984). Alzheimer's disease: a current review. *Can Fam Physician*. 30: 595-599.

**Weidemann A., König G., Bunke D., Fischer P., Salbaum J.M., Masters C.L. and Beyreuther K.** (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*. 57(1): 115-26.

**Weingarten M.D., Lockwood A.H, Hwo S.Y. and Kirschner M.W.** (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 1858-1862.

**Weinshenker D. and Szot P.** (2002) The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. *Pharmacol. Ther.* 94(3): 213-233.

**Weinshilboum R. and Axelrod J.** (1971) Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ. Res.* 28(3): 307-315.

**Wenk G.L.** (2003) Neuropathologic Changes in Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry*. 64(9): 7-10.

**Westlund K.N., Bowker R.M., Ziegler M.G. and Coulter J.D.** (1982) Descending noradrenergic projections and their spinal terminations. *Prog. Brain Res.* 57: 219-238.

**Westlund K.N., Bowker R.M., Ziegler M.G. and Coulter J.D.** (1983) Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res.* 263(1): 15-31.

**Whitehouse P.J, Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., Coyle J.T. and Delon M.R.** (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 215: 1237- 1239.

**Whitehouse P.J., Hedreen J.C., White C.L. and Price D.L.** (1983) Basal forebrain neurons in the dementia of Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 13: 243-248.

**Whitlock J.R., Heynen A.J., Shuler M.G. and Bear M.F.** (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 313 (5790): 1093-1097.

**Wilcock G.K., Esiri M.M., Bowen D.M. and Smith C.C.** (1982) Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J. Neurol. Sci.* 57: 407-417.

**Wiley R.G., Oeltmann T.N. and Lappi D.A.** (1991) Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Res.* 562(1): 149-153.

**Williams G.V. and Goldman-Rakic P.S.** (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature*. 376: 572-575.

**Williamson J., Goldman J. and Marder K.S.** (2009) Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Neurologist*. 15 (2): 80-86.

**Wilson R.S., Yu L., Trojanowski J.Q., Chen E-Y, Boyle P.A., Bennett D.A. and Schneider J.A.** (2013) TDP-43 Pathology, Cognitive Decline, and Dementia in Old Age. *JAMA Neurology*. 70(11): 1418-1424.

**Wilson A.C., Dugger B.N., Dickson D.W. and Wang D.S.** (2011) TDP-43 in aging and Alzheimer's disease - a review. *Int J Clin Exp Pathol.* 4(2): 147-155.

**Winton M.J , Igaz L.M., Wong M.M., Kwong L.K., Trojanowski J.Q. and Lee V.M.** (2008) Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J. Biol. Chem.* 283: 13302–13309.

**Wise R.A.** (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience.* 5: 1-5.

**Wisman L.A.B., Sahin G., Maingay M., Leanza G., and Kirik D.** (2008) Functional convergence of dopaminergic and cholinergic inputs is critical for hippocampus-dependent working memory. *The Journal of Neuroscience.* 28(31): 7797-7807.

**Woolf N.J.** (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 37(6): 475-524.

**Wirhth O., Multhaup G. and Bayer T.A.** (2004) A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide—the first step of a fatal cascade. *J. Neurochem.* 91: 513–520.

**Wright A., Zinn R., Hohensinn B., Konen L.M., Beynon S.B., Tan R.B., Clark I.A., Abdipranoto A. and Visses B.** (2013) Neuroinflammation and neuronal loss precede A-beta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE.* 8: 59586.

**Yan Z. and Feng J.** (2004) Alzheimer's disease: interactions between cholinergic functions and beta-amyloid. *Curr. Alzheimer Res.* 1(4): 241-248.

**Yan Q. and Johnson E.M.** (1988) An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J. Neurosci.* 8(9): 3481-3498.

**Yan Q. and Johnson E.M.** (1989) Immunohistochemical localization and biochemical characterization of nerve growth factor receptor in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 290(4): 585-598.

**Yoshimura N., Sasa M., Yoshida O. and Takaori S.** (1990) Alpha 1-adrenergic receptor-mediated excitation from the locus coeruleus of the sacral parasympathetic preganglionic neuron. *Life Sci.* 47(9): 789-797.

**Zaborszky L., Gaykema R.P., Swanson D.J. and Cullinan W.E.** (1997) Cortical input to the basal forebrain. *Neuroscience.* 79(4): 1051-1078.

**Zarow C., Lyness S.A., Mortimer J.A. and Chui H.C.** (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch. Neurol.* 60: 337–341.

**Zarros A.C., Kalopita K.S. and Tsakiris S.T.** (2005) Serotonergic impairment and aggressive behavior in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol. Exp.* 65: 277-286.

**Zhang Y.J., Xu Y.F., Cook C., Gendron T.F., Roettges P., Link C.D., Lin W.L., Tong J., Castanedes-Casey M., Ash P., Gass J., Rangachari V., Buratti E., Baralle F., Golde T.E., Dickson D.W. and Petrucelli L.** (2009) Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 21: 7607-7612.

**Zhang Y., Thompson R., Zhang H. and Xu H.** (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*. 43: 1-13.

**Zheng W.H., Bastianetto S., Mennicken F., MA W. and Kar S.** (2002) Amyloid-beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience*. 115(1): 201-211.

**Zheng H. and Koo E.H.** (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*. 1: 5.

**Zarow C., Lyness S.A., Mortimer J.A. and Chui H.C.** (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol*. 60(3): 337-341.

**Zubenko G.S., Moossy J. and Kopp U.** (1990) Neurochemical correlates of major depression in primary dementia. *Arch. Neurol*. 47(2):209-214.

**Zweig R.M., Ross C.A., Hedreen J.C., Peyser C., Cardillo J.E., Folstein S.E. and Price D.L.** (1992) Locus coeruleus involvement in Huntington's disease. *Arch. Neurol*. 49: 152-156.

**Zweig R.M., Cardillo J.E., Cohen M., Giere S. and Hedreen J.C.** (1993) The locus ceruleus and dementia in Parkinson's disease. *Neurology*. 43: 986-991.