



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**RUOLO DELLA ISOFORMA 3 DELLO
SCAMBIATORE SODIO-CALCIO NEL DANNO
METABOLICO INDOTTO DA GLICERALDEIDE:
POSSIBILI IMPLICAZIONI NELLA MALATTIA DI
ALZHEIMER**

Relatrice: Chiar.ma
Prof.ssa Simona Magi

Tesi di Laurea di:
Tiziano Serfilippi

A.A. 2020/2021

Sommario

1 INTRODUZIONE	3
1.1 Epidemiologia e fattori di rischio della Malattia di Alzheimer.....	3
1.2 Malattia di Alzheimer: clinica.....	5
1.3 Patogenesi della Malattia di Alzheimer	8
1.4 L’Intricato network di interazioni tra il metabolismo energetico, l’omeostasi del calcio e lo stress ossidativo nella Malattia di Alzheimer.....	15
1.4.1 Metabolismo energetico	16
1.4.2 <i>Advanced Glycation End-products</i> (AGEs).....	18
1.4.3 Regolazione dell’omeostasi del calcio e scambiatore sodio-calcio (<i>Sodium-Calcium Exchanger, NCX</i>).....	22
1.4.4 Specie reattive dell’ossigeno (<i>Reactive Oxygen Species, ROS</i>)	30
1.4.5 La Malattia di Alzheimer e i circoli viziosi che ne sostengono la patogenesi.....	31
2 OBIETTIVO DELLA TESI	34
3 MATERIALI E METODI	36
3.1 Colture cellulari	36
3.2 Modello sperimentale di Alzheimer.....	36
3.3 Silenziamento di NCX1 e NCX3.....	37
3.4 Valutazione della vitalità cellulare	37
3.5 Saggio ATP	39
3.6 Anticorpi.....	39
3.7 Western Blot	40
3.8 Analisi dell’attività di NCX	41
3.9 Valutazione della produzione mitocondriale di ROS	42
3.10 Farmaci e sostanze chimiche	43
3.11 Analisi dei dati	43
4 RISULTATI	44
4.1 Il bloccante farmacologico SN6 protegge dal danno indotto da GA.....	44

4.2 Il silenziamento tramite RNA interference di specifiche isoforme di NCX protegge dal danno metabolico indotto da GA.....	46
4.3 Il silenziamento tramite <i>RNA interference</i> di NCX3, ma non di NCX1, promuove la vitalità cellulare in cellule sottoposte a danno indotto da GA	47
4.4 Il danno metabolico indotto da GA riduce l'attività di NCX, ma il silenziamento di NCX3 ne riporta i livelli a valori simili a quelli di controllo	49
4.5 L'insulto metabolico provocato dalla somministrazione di GA riduce l'espressione dell'isoforma 3 dello scambiatore sodio-calcio	50
4.6 Il silenziamento di NCX3 riduce significativamente i livelli di ROS indotti dall'esposizione a GA	52
4.7 Il silenziamento di NCX3 previene l'incremento dei livelli del marker A β 1-42	53
4.8 Il silenziamento di NCX3 previene l'incremento dei livelli del marker ptau.....	55
5 DISCUSSIONE.....	57
Conclusioni	63
<i>RINGRAZIAMENTI</i>	64
Bibliografia	66

1 INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia e fattori di rischio della Malattia di Alzheimer

La Malattia di Alzheimer è la più comune patologia neurodegenerativa ed è caratterizzata da perdita di memoria e declino delle funzioni cognitive (1). Essa è la causa principale di demenza, essendo responsabile del 50-75% dei casi, ed è primariamente una malattia dell'anziano poiché la sua prevalenza raddoppia approssimativamente ogni 5 anni dopo i 65 anni (2). Al momento, più di 36,5 milioni di persone nel mondo sono affette da demenza e si stima che entro il 2050 13,8 milioni di persone saranno diagnosticate con demenza da Alzheimer (3). Il costo totale annuo correlato alla cura dei pazienti che soffrono di demenza, comprensivo di degenze a lungo termine presso le residenze sanitarie assistenziali, è stato pari a 305 miliardi nel 2020 e si stima supererà 1,1 trilioni nel 2050 (4).

La Malattia di Alzheimer è una patologia multifattoriale, il cui fattore di rischio principale è l'età avanzata, il che suggerisce che processi biologici correlati all'età siano implicati nella patogenesi, ma vanno anche tenuti in considerazione gli effetti cumulativi di differenti fattori di rischio ed esposizioni ambientali (5).

Tra il 2 e il 5 % dei casi di Malattia di Alzheimer sono ad esordio giovanile (6). I parenti di primo grado di pazienti con Malattia di Alzheimer hanno un rischio maggiore di sviluppare il morbo stesso nel corso della loro vita rispetto alla popolazione generale (7). Si presuppone, quindi, che sia fattori genetici che ambientali condivisi dai familiari siano alla base del fenomeno della aggregazione familiare (5). La forma familiare della Malattia di Alzheimer è una variante autosomica dominante rara (<1%), che rientra tra le forme ad

esordio giovanile (8) ed è causata da mutazioni della proteina precursore della beta amiloide (9), della presenilina 1 (10) o della presenilina 2 (11).

La forma più comune della Malattia di Alzheimer è quella sporadica a esordio tardivo, in cui vi sono più di 20 determinanti genetici che incrementano o riducono il rischio. Il maggior gene di suscettibilità è, tuttavia, l'allele APOE ε4, che codifica per l'Apolipoproteina E (8); si tratta di un gene di suscettibilità, non essendo quindi né necessario né sufficiente per lo sviluppo della Malattia di Alzheimer (12). Approssimativamente tra il 15 e il 20% dei casi di Alzheimer sono attribuibili all'allele APOE ε4 (6).

Tra i fattori di rischio modificabili abbiamo: il fumo di tabacco, il consumo di alcool, il sovrappeso e l'obesità, l'ipertensione, i livelli di colesterolo, fattori dietetici e nutrizionali, il diabete, malattie cardiovascolari e fattori psicosociali. Studi trasversali ormai superati hanno trovato una prevalenza ridotta di Malattia di Alzheimer tra i fumatori rispetto ai non-fumatori (13). Tuttavia, tale effetto protettivo era probabilmente dovuto a un bias di sopravvivenza (5) e metanalisi di successivi studi di follow-up hanno concluso che il fumo di tabacco fosse associato ad un rischio maggiore di sviluppare la Malattia di Alzheimer (14,15). Inoltre, è stato dimostrato che un abuso di alcool aumenti il rischio di Alzheimer di 3 volte rispetto alla popolazione generale (16). Rimane tuttavia controverso il ruolo del consumo moderato di alcool nelle demenze, poiché la protezione che questo sembra esercitare potrebbe essere dovuta a errori sistematici, quali uno stile di vita salutare o lo stato socioeconomico, e ai differenti approcci alla misurazione del consumo di alcool (5). Anche la relazione tra *body mass index* (BMI) e il rischio di demenza sembra non essere

univoca. Infatti, un alto BMI in un'età intorno ai 50 anni è correlato ad un maggior rischio di sviluppare demenza nei successivi 20-25 anni (17). Tuttavia, un basso BMI in età avanzata è anch'esso correlato ad un rischio aumentato di sviluppare la patologia nei successivi 5-6 anni (18,19). Anche l'ipertensione non controllata tra i 40 e i 60 anni di età è correlata ad un aumentato rischio di Alzheimer in età avanzata (20,21), così come elevati livelli ematici di colesterolo totale (22,23).

Il diabete, soprattutto se di lunga durata, sembra giocare un ruolo cruciale nello sviluppo non solo della demenza vascolare ma anche della Malattia di Alzheimer, tale che anche una ridotta tolleranza glucidica nei grandi anziani è un fattore di rischio per il suo sviluppo (24,25).

Infine, è stato dimostrato che un'educazione in età infantile, un lavoro di alta complessità in età adulta, una ricca rete sociale durante tutta la vita e la frequente partecipazione in attività fisicamente e mentalmente stimolanti riducano il rischio di sviluppare la Malattia di Alzheimer e la demenza (5,26).

1.2 Malattia di Alzheimer: clinica

La presentazione tipica della Malattia di Alzheimer è quella di un paziente anziano con insidiose e progressive disfunzioni della memoria episodica (27). Il corso della Malattia di Alzheimer è generalmente diviso in 3 stadi con un deterioramento cognitivo e funzionale ad andamento progressivo. I 3 stadi sono descritti come lieve o precoce, moderato o intermedio e severo o avanzato (28).

I primi sintomi sono spesso erroneamente attribuiti all'invecchiamento o allo stress (29), ma test neuropsicologici accurati possono rivelare lievi difficoltà cognitive fino a 8 anni prima che il paziente soddisfi i criteri clinici per la diagnosi (30). In questa finestra clinica possiamo anche trovare difficoltà nelle funzioni esecutive come l'attenzione, la pianificazione, la flessibilità e il pensiero astratto (30), così come apatia e depressione (31). Lo stadio iniziale della malattia è stato anche definito *mild cognitive impairment* o lieve deterioramento cognitivo, che sembra essere uno stadio di transizione tra un invecchiamento fisiologico e la demenza, nonché un prodromo della Malattia di Alzheimer, che può presentarsi con una varietà di sintomi, il preponderante dei quali è la perdita di memoria (32).

Nello stadio iniziale, il peggioramento della perdita di memoria, che si traduce in una difficoltà a ricordare e assimilare nuove informazioni (30), porta alla diagnosi. Per esempio, un paziente con Alzheimer potrebbe dimenticare eventi o conversazioni recenti, perdere oggetti, avere difficoltà nel pensare alla parola corretta, ripetere più volte la stessa domanda e divenire meno flessibile e più esitante verso il provare nuove cose (28). In una piccola percentuale di pazienti i deficit principali possono non essere legati alla memoria ma ad agnosia, aprassia e afasia (33). Non tutte le funzioni mnemoniche sono colpite in egual misura dalla malattia. Infatti, la memoria episodica (ovvero i ricordi riguardanti la vita passata del paziente), la memoria semantica (ovvero nozioni generali imparate nel corso della vita) e la memoria procedurale (che permette al soggetto di compiere azioni senza una consapevolezza cosciente, come usare una forchetta per mangiare) sono lese in maniera

minore (34,35). Vi sono anche problemi nella sfera del linguaggio, con una riduzione del vocabolario e della fluenza (33). Spesso i pazienti continuano a svolgere molte delle attività della vita quotidiana in maniera indipendente, ma possono avere necessità di assistenza nei compiti con un carico cognitivo maggiore (33).

Nello stadio intermedio, il deterioramento cognitivo progressivo porta all'incapacità di compiere la maggior parte delle attività della vita quotidiana. La memoria a lungo termine, che era rimasta precedentemente intatta, viene danneggiata. Le alterazioni del linguaggio peggiorano per l'aumento delle parafasie e della difficoltà nel trovare le parole. Le sequenze ideomotorie complesse non possono più essere compiute con successo a causa della mancanza della loro organizzazione. Alcuni pazienti sviluppano anche allucinazioni, soprattutto visive. Spesso i pazienti perdono il controllo emotivo con comparsa di irritabilità, accompagnata da aggressioni fisiche o verbali. Tutto questo determina la necessità di supporto per il paziente nello svolgimento delle azioni della vita quotidiana da parte di *caregivers* (33).

Nello stadio finale o tardivo della malattia, il paziente è completamente dipendente dai *caregivers* (36) e quasi tutte le funzioni cognitive sono severamente colpite. Le abilità linguistiche sono ridotte a singole frasi o singole parole, arrivando alla perdita completa del linguaggio. Spesso i pazienti manifestano estrema apatia e indifferenza. La massa muscolare e le capacità motorie si deteriorano al punto che il paziente è costretto all'allettamento ed è incapace perfino di nutrirsi. Spesso la morte sopraggiunge per comorbidità, non per la malattia in sé (33).

1.3 Patogenesi della Malattia di Alzheimer

Sebbene la demenza sia stata descritta anche in testi antichi, risalenti perfino a millenni fa (per esempio: “soccorri tuo padre nella vecchiaia, sii indulgente anche se perde il senno” Antico Testamento-Siracide 3:13), la nostra comprensione delle cause che la sottendono ha iniziato ad accelerare solo dagli anni '80 (37).

Fu Alois Alzheimer il primo a descrivere la malattia che porta il suo nome nel celebre articolo "*About a peculiar disease of the cerebral cortex*", pubblicato nel 1907. Aloysius "Alöis" Alzheimer descrisse attentamente i sintomi di una sua paziente di nome Auguste Deter, una donna di 51 anni in cura presso il manicomio statale di Francoforte, Germania. Quando Auguste Deter morì, Alzheimer usò la colorazione argentea per esaminare il suo cervello al microscopio e osservò le placche neuritiche, i grovigli neurofibrillari e l'angiopatia amiloide (37).

Gli elementi caratteristici della Malattia di Alzheimer sono, infatti, le placche senili e i grovigli neurofibrillari, composti principalmente dal peptide β -amiloide ($A\beta$) (38) e dalla forma iperfosforilata della proteina tau (39), rispettivamente. Inoltre, si ritrovano frequentemente anche neuriti distrofiche, astrogliosi, attivazione microgliale e angiopatia amiloide (40). Le conseguenze di questi processi patologici includono una neurodegenerazione con perdita di neuroni e di sinapsi che portano a una vera e propria atrofia cerebrale (41).

Le placche amiloidi sono accumuli extracellulari composti principalmente da peptidi A β con 40 o 42 aminoacidi (A β 40 e A β 42), che sono due prodotti della degradazione di APP (*Amyloid Precursor Protein*) (41).

Tra gli aggregati di A β , non vi sono solo le placche amiloidi, ma anche le fibrille amiloidi, che a loro volta derivano da complessi processi di aggregazione che coinvolgono intermedi quali oligomeri e protofibrille e sono i principali componenti delle placche stesse. I monomeri di A β , infatti, hanno una naturale tendenza all'aggregazione e tali aggregati possono essere divisi in base al loro aspetto in microscopia elettronica in oligomeri, protofibrille e fibrille mature. L'uso di centrifugazione e ultracentrifugazione, unito a quello di diversi solventi, permette un'ulteriore classificazione degli aggregati di A β in solubili e insolubili (42). Per lungo tempo si è ritenuto che la forma di A β più patogena fossero le placche amiloidi; tuttavia, non si trovò una correlazione lineare tra il declino cognitivo dei pazienti e il deposito delle placche (43). Ora, si ritiene che i veri responsabili della tossicità indotta da A β siano gli oligomeri solubili e le protofibrille e che le placche e le fibrille contribuiscano alla tossicità attraverso il rilascio dei suddetti intermedi tossici di A β (42).

Le placche di amiloide si depongono inizialmente nell'isocorteccia e solo successivamente nelle strutture sottocorticali, mentre coinvolgono la corteccia entorinale e le formazioni ippocampali solitamente in misura minore rispetto ai grovigli neurofibrillari (41). Questi ultimi sono composti principalmente da filamenti elicoidali accoppiati di proteina tau iperfosforilata. Le prime strutture ad essere coinvolte nella patogenesi tau-mediata sono

l'ippocampo e la corteccia entorinale, in seguito questa coinvolgerà anche l'isocorteccia associativa (41).

Un nodo centrale della patogenesi della Malattia di Alzheimer è costituito dalla proteina APP. Sebbene questa sia stata indagata in diversi studi, la sua funzione fisiologica resta ancora incerta. Sembra implicata nella crescita di neuriti, nella sinaptogenesi, nel traffico proteico neuronale lungo l'assone, nella trasduzione del segnale attraverso la membrana, nell'adesione cellulare e nel metabolismo del calcio (44). APP è soggetta ad un taglio proteolitico che porta alla formazione di diversi frammenti, i quali mediano diverse funzioni, a volte in contrapposizione (45). APP è una proteina transmembrana sintetizzata nel reticolo endoplasmatico e trasportata attraverso l'apparato di Golgi al trans-Golgi-network, dove se ne ritrova la concentrazione più alta (46). APP può essere processata attraverso due diverse vie, la via amiloidogena e la via non-amiloidogena (fig. 1), le quali implicano tagli sequenziali operati da specifiche secretasi (47). La maggior parte di APP segue la via non-amiloidogena. Per prima cosa, APP viene clivata da una α -secretasi, generando una APP N-terminale secreta (sAPP α) e un frammento C-terminale (CTF), che è ulteriormente clivato da una γ -secretasi (47).

Il taglio di APP da parte dell' α -secretasi impedisce la formazione di A β , poiché il sito di taglio si trova all'interno del dominio A β , e rilascia sAPP α (48), che ha un ruolo importante nella plasticità sinaptica, nella sopravvivenza e svolge un ruolo protettivo nei confronti dei processi che inducono eccitotossicità (49,50). Nella via amiloidogena APP è tagliata da una β -secretasi nei siti Asp1 (sito β) e Glu11 (sito β'). Glu11 è il sito di clivaggio β più importante,

che porta alla formazione di un CTF di 89 aminoacidi (C89), ulteriormente clivato da una γ -secretasi, producendo un peptide $A\beta_{11-40/42}$ troncato. Il clivaggio nel sito Asp1 porta alla formazione di un CTF con 99 aminoacidi, ulteriormente tagliato da una γ -secretasi, producendo $A\beta$ (47). *Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1* (BACE1) è la β -secretasi dominante in vivo; infatti, il knockout di BACE1 blocca completamente la generazione di $A\beta$ (51). $A\beta$ quindi, che ricordiamo essere il componente principale delle placche senili che si ritrovano nei cervelli affetti da Malattia di Alzheimer, è generata da tagli sequenziali di APP da parte di β - e γ -secretasi. Risulta quindi fondamentale comprendere i meccanismi che portano ad un aumento della quota di APP dirottata nella via amiloidogena.

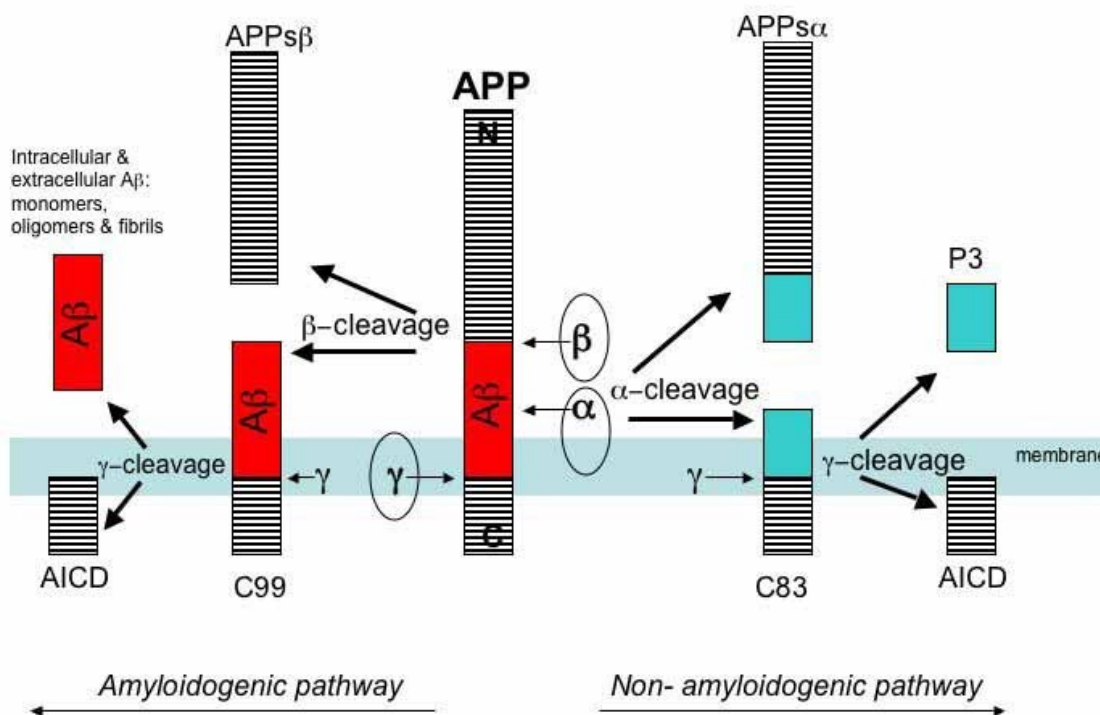


Figura 1: Vie amiloidogena e non amiloidogena del processamento di APP. Immagine tratta da (52).

I primi studi che hanno descritto l'influenza della bioenergetica sul destino di APP risalgono agli anni '90. Questi studi hanno dimostrato come perturbazioni bioenergetiche prodotte da agenti disaccoppianti determinino un accumulo di APP nel Golgi (53) e come la deprivazione di glucosio in cellule COS, in aggiunta a un inibitore della glicolisi (il 2-deossi-D-glucosio), portino ad un calo dei livelli di sAPP α . Anche l'inibizione di COX con azoturo di sodio riduce i livelli di sAPP α (54). È stato poi osservato come l'inibizione della glicolisi causata dal 2-deossi-D-glucosio causasse una riduzione della glicosilazione di APP, suggerendo l'ipotesi che un'alterazione della bioenergetica possa influenzare vie di regolazione del processamento di APP (55). La trascrizione di BACE1 è influenzata dagli stessi fattori che regolano la biogenesi dei mitocondri. Il recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR γ) regola la trascrizione di BACE1 e del coattivatore 1- α del recettore attivato dai proliferatori dei perossisomi (PGC1 α), che modula la biogenesi mitocondriale (56). La sovraespressione di PGC1 α in cellule N2a di neuroblastoma riduce la secrezione di A β e incrementa quella di sAPP α (57).

Mentre in passato si riteneva che le placche di amiloide fossero cruciali per lo sviluppo della Malattia di Alzheimer, ora si pensa che siano gli oligomeri A β solubili le forme di A β più patogene: oligomeri purificati da cervelli con Alzheimer e applicati a neuroni in vitro inibiscono la *long-term potentiation* (ovvero un fenomeno di plasticità sinaptica che consiste in un persistente potenziamento del segnale sinaptico innescato dal *pattern* di attività della sinapsi stessa), causano disfunzioni sinaptiche, danneggiano i dendriti, inducono l'iperfosforilazione di tau e portano a morte neuronale (58,59,60). Per cui le

placche potrebbero comportarsi da reservoir dalle quali gli oligomeri A β diffondono, oppure potrebbero agire come un meccanismo protettivo in grado di sequestrare peptidi tossici fino alla saturazione (61). Sebbene l'accumulo di A β sia necessario per la diagnosi di Malattia di Alzheimer, il fatto che una porzione significativa di anziani presenti depositi considerevoli di amiloide senza mostrare alcun sintomo indica che essa non sia sufficiente per lo sviluppo di demenza da Malattia di Alzheimer, il che supporta l'ipotesi che le placche siano un meccanismo protettivo (62).

Anche tau è fondamentale nel processo patogenetico della Malattia di Alzheimer. Tuttavia, mutazioni del solo gene per la proteina tau non determinano la Malattia di Alzheimer, a differenza di mutazioni dei geni per la β -amiloide (63).

Tau è primariamente una proteina neuronale implicata nell'assemblaggio e stabilità dei microtubuli ed è regolata attraverso la sua fosforilazione (64). Nello specifico l'iperfosforilazione di tau ne deprime l'attività di assemblaggio dei microtubuli e il suo legame agli stessi (65). In realtà, tau rappresenta una famiglia di sei proteine derivanti dallo splicing alternativo di un singolo gene (66). Queste proteine differiscono per la presenza di 3 o 4 siti di legame alla tubulina vicino al terminale-C e due, uno o zero inserti di 29 aminoacidi vicino al terminale-N. Nella Malattia di Alzheimer la proteina tau è abnormemente iperfosforilata e si accumula in grovigli fibrillari di filamenti elicoidali accoppiati, filamenti ripiegati e lineari e l'iperfosforilazione ne precede l'accumulo (64). Quest'ultimo è associato a neurofibrillazione e demenza non solo nella Malattia di Alzheimer, ma anche in altre patologie neurodegenerative. È probabile che

L'iperfosforilazione di tau sia dovuta ad alterazioni conformazionali della stessa tau che la rendono un substrato più permissivo verso la fosforilazione o un substrato meno permissivo verso la defosforilazione (64). Infatti, lo stato di fosforilazione di una fosfoproteina è un equilibrio che scaturisce dall'attività complessiva di chinasi e fosfatasi. Tau, che ha più di 30 siti di fosforilazione, è un substrato per diverse chinasi, le più importanti tra le quali sono la glicogeno sintasi chinasi 3, la chinasi ciclina-dipendente 5, la protein chinasi A, le chinasi calcio e calmodulina-dipendenti, la proteina chinasi attivata dal mitogeno ERK1/2 e la proteina chinasi attivata dallo stress (67). Le principali fosfatasi sono, invece, le protein fosfatasi 2A e 1 (68). Tuttavia, la fosforilazione di tau non è regolata solo dall'attività dei suddetti enzimi, bensì anche dal suo stato conformazionale: la tau libera è più soggetta a fosforilazione rispetto alla tau legata ai microtubuli. Oltre alla fosforilazione tau va incontro anche a glicosilazione e quest'ultima precede la prima. Inoltre, studi in vitro hanno dimostrato che la glicosilazione possa promuovere la fosforilazione di tau (69).

Nei cervelli di pazienti con malattia di Alzheimer i livelli di tau sono tra le 4 e le 8 volte maggiori rispetto ai controlli della stessa età a causa di un aumento della forma iperfosforilata, aumento che non è rispecchiato da un contestuale incremento dei livelli di mRNA per la stessa tau. La forma iperfosforilata di tau va a costituire principalmente due *pool*, quello dei grovigli neurofibrillari e una forma non fibrillare nel citosol. Di nota, la forma polimerizzata nei grovigli neurofibrillari sembra essere inerte, mentre la forma libera nel citosol non interagisce con la tubulina ma sequestra la forma non iperfosforilata di tau e le principali proteine associate ai microtubuli (*Microtubule-Associated Proteins*, MAP1A/B e

MAP2), determinando quindi un ridotto assemblaggio degli stessi e un'instabilità con successivo disassemblaggio (64).

Sebbene risulti ovvio che la patologia β -amiloide e quella tau siano fondamentali nella patogenesi della Malattia di Alzheimer, è ancora poco chiaro il nesso tra le due. Infatti, se complessivamente non vi è dubbio che $A\beta$ e tau contribuiscano entrambe alla patogenesi della Malattia di Alzheimer e alla sua progressione, resta ancora da definire quale delle due proteine possa rappresentare il fattore scatenante e/o favorente il progressivo sviluppo della malattia. Va sottolineato che la Malattia di Alzheimer è una patologia multifattoriale, caratterizzata da eventi correlati tra loro che inducono una serie progressiva di modificazioni nell'ambito delle quali si collocano le modificazioni di $A\beta$ e tau. Nei paragrafi successivi verranno descritti in maggiore dettaglio i meccanismi cellulari nonché i determinati molecolari che primariamente possono contribuire allo sviluppo ed alla progressione di questa malattia.

1.4 L'Intricato network di interazioni tra il metabolismo energetico, l'omeostasi del calcio e lo stress ossidativo nella Malattia di Alzheimer

La Malattia di Alzheimer è una patologia multifattoriale ed eterogenea, che coinvolge diversi meccanismi eziopatogenetici. Tra i processi che sono risultati essere maggiormente implicati nel promuovere l'insorgenza e la progressione della malattia, le disfunzioni mitocondriali stanno recentemente emergendo come principali determinanti di una serie di eventi che convergono nella degenerazione neuronale (70). Tali eventi includono

l'aumento della produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), l'alterazione del metabolismo energetico e l'induzione di eventi apoptotici. Tutti questi processi, oltre ad essere correlati con l'alterazione delle dinamiche mitocondriali, sono anche alimentati ed accomunati da un ulteriore importante evento cellulare, ossia la disregolazione dell'omeostasi del calcio.

Il calcio è un messaggero intracellulare ubiquitario implicato in numerose funzioni cellulari come regolatore delle stesse. La sua regolazione è un fenomeno complesso che sfrutta numerosi enzimi ATP-dipendenti e che possono subire modificazioni conformazionali da parte dei ROS.

La disponibilità di ATP della cellula dipende strettamente dall'efficienza del suo metabolismo energetico. I ROS possono ridurre questa efficienza riducendo la funzionalità degli enzimi in esso implicati. A sua volta il metabolismo energetico è il principale produttore di ROS. I prossimi paragrafi saranno volti a definire la correlazione esistente tra metabolismo energetico, disregolazione dell'omeostasi del calcio e produzione dei ROS nell'ambito della Malattia di Alzheimer, con particolare riferimento alla relazione esistente tra questi processi e la variazione dei livelli di A β e ptau.

1.4.1 Metabolismo energetico

Il cervello è un organo con un'alta richiesta energetica, supportata da una efficiente produzione di ATP attraverso la glicolisi, il ciclo degli acidi tricarbossilici e la fosforilazione ossidativa (71). Tuttavia, il metabolismo del glucosio nella Malattia di Alzheimer è significativamente alterato (72). Diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato come

l'inefficiente utilizzo del glucosio (e quindi la scarsa produzione di ATP) sia connesso al danno ossidativo, in particolare a modificazioni ossidative di enzimi coinvolti nel metabolismo glucidico, le quali spesso portano a una ridotta funzionalità degli enzimi stessi (72). Per esempio, studi di proteomica redox di tessuti cerebrali con Alzheimer hanno rivelato la presenza di modificazioni ossidative negli enzimi glicolitici aldolasi, triosofosfato isomerasi (TPI), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), fosfoglicerato mutasi 1 (PGAM1) e α -enolasi (73,74). Inoltre, modificazioni ossidative dell'aconitasi (enzima chiave del ciclo degli acidi tricarbossilici), della creatinin chinasi (enzima fondamentale per mantenere livelli costanti di ATP nei neuroni) e dell'ATP sintetasi nei mitocondri neuronali spiegano in parte le riduzioni del metabolismo del glucosio e dei livelli di ATP nei pazienti con Alzheimer (73,74). Anche il danno ossidativo al DNA mitocondriale potrebbe contribuire all'inefficiente produzione di energia e va sottolineato come la disfunzione mitocondriale e l'insulino-resistenza siano intimamente connesse (73).

L'insulino-resistenza nel diabete mellito di tipo 2 è stata definita come "una ridotta sensibilità dei tessuti all'azione dell'insulina" (75). Allo stesso modo, l'insulino-resistenza cerebrale può essere definita come l'incapacità delle cellule cerebrali di rispondere efficacemente all'insulina (76). Questa incapacità potrebbe essere dovuta a una downregulation dei recettori dell'insulina, all'inabilità dei recettori dell'insulina nel legare la stessa o a una disfunzione nella cascata di segnalazione dell'insulina. A livello cellulare, questi fenomeni potrebbero manifestarsi come una compromissione della neuroplasticità, della regolazione dei recettori e del rilascio di neurotrasmettitori e di processi direttamente

implicati nel metabolismo insulino-dipendente, come l'uptake di glucosio nei neuroni che esprimono GLUT4 (77).

Un crescente insieme di evidenze dimostra che le vie di segnalazione insuliniche sono alterate in tessuti cerebrali postmortem di soggetti con Malattia di Alzheimer (71). Nel 2005, de la Monte e colleghi hanno dimostrato una riduzione dei livelli di mRNA e di espressione della proteina correlata relativamente a insulina, recettore dell'insulina, IGF1, IGF2 e di altre proteine implicate nella cascata segnaletica insulinica (78). In seguito, nel 2018, Talbot e colleghi hanno descritto la presenza di anomali stati di attivazione di molti dei componenti chiave e attivatori delle vie di segnale del recettore dell'insulina (79). Va anche sottolineato come la somministrazione intranasale di insulina in soggetti con Malattia di Alzheimer e Mild Cognitive Impairment migliori le funzioni mnemoniche e cognitive (80).

1.4.2 *Advanced Glycation End-products (AGEs)*

Un altro fenomeno che accomuna la patologia diabetica alla Malattia di Alzheimer è la glicosidazione, ovvero il processo che porta alla glicazione non enzimatica delle proteine ed al successivo danno ossidativo a loro carico (73,81,82).

La glicazione è una reazione non enzimatica che avviene tra un carboidrato e una molecola con un gruppo aminico libero, come una proteina. Questa reazione irreversibile e cumulativa si verifica in tutto il corpo spontaneamente ed è ben diversa dalla glicosilazione, ovvero una reazione enzimatica necessaria alla sintesi di glicoproteine (83). In particolare, le reazioni di glicazione non enzimatica di Maillard portano alla formazione dei cosiddetti *Advanced Glycation End-product (AGEs)* (83).

In situazioni patologiche come lo stato infiammatorio, l'incremento dei livelli di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (*Reactive Nitrose Species, RNS*) o l'iperglicemia, la produzione di queste molecole aumenta notevolmente (83). Inoltre, gli AGEs possono avere anche un'origine esogena, ovvero la dieta, contribuendo al pool di AGEs. Infatti, la reazione di Maillard tra zuccheri e proteine avviene anche durante il processo di cottura (84). Livelli elevati di AGEs sono associati ad un declino cognitivo più rapido e una crescente letteratura suggerisce che siano implicati nella patogenesi di Alzheimer, Parkinson e demenza cerebrovascolare (85).

Gli AGEs possono esercitare i loro effetti con due meccanismi: uno recettore-indipendente tramite la formazione di crosslink e uno recettore-dipendente tramite il legame con i RAGE (84). Per esempio, a livello della cute gli AGEs si legano al collagene, riducendone la flessibilità (86). A livello del rene si legano alle proteine della capsula di Bowman, portando all'accumulo di tossine uremiche e alla comparsa di complicanze come nefropatie e insufficienza renale (87). A livello degli occhi si legano all'opsina, portando a degenerazione maculare della retina (88). A livello del cuore si legano ai vasi, determinando la progressione della malattia coronarica (89). Ma soprattutto, a livello cerebrale si legano alla β -amiloide, determinandone un accumulo nelle placche e una resistenza all'azione di enzimi litici (90). Il recettore degli AGEs più studiato è RAGE, un recettore transmembrana multiligando che appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline (91). I recettori RAGE sono espressi principalmente sulle cellule vascolari, endoteliali, del muscolo liscio, del sistema monocito-macrofagico, sulla microglia, ma anche su astrociti e neuroni (91,92,93). RAGE è implicato

nella patogenesi di diverse malattie croniche, come malattie cardiovascolari, diabete e ipertensione (91). L'interazione di RAGE con gli AGE induce l'attivazione di diverse cascate intracellulari, che coinvolgono il fattore nucleare κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κB), il fattore di necrosi tumorale α (*Tumor Necrosis Factor- α* , TNF- α), l'interleuchina 6 e la proteina C reattiva (94). Tutte queste vie conducono ad uno stato proinfiammatorio con aumento dello stress ossidativo (85). RAGE sembra coinvolto nello stress ossidativo indotto dagli AGEs e nell'infiammazione cronica e subclinica del cervello con Malattia di Alzheimer (95). Inoltre, l'espressione di RAGE è aumentata nel cervello con Alzheimer e agisce da recettore di superficie per A β , promuovendo l'influsso di A β circolante attraverso la barriera ematoencefalica (96).

Dopo aver sviluppato degli anticorpi specifici per sei tipologie di strutture molecolari diverse, Takeuchi e collaboratori sono riusciti a isolare sei classi di AGEs (AGE1-AGE6) dal siero di pazienti diabetici (97). In seguito a studi in vitro effettuati su colture primarie neuronali è stato possibile definire che la citotossicità più elevata è legata all'azione della classe AGE-2, ovvero i derivati della gliceraldeide (GA). Questi risultati hanno portato i ricercatori a riferirsi a questa classe di AGEs con l'eponimo TAGE (*Toxic AGEs*) per differenziarli dalle altre (98).

La GA è un composto che attraversa liberamente o può essere trasportato attraverso le membrane cellulari e la sua formazione in vivo è stata ricondotta principalmente a 3 diverse vie metaboliche: la glicolisi, la via dei polioli e il metabolismo del fruttosio (97). Il substrato intermedio della glicolisi, la gliceraldeide-3-fosfato, viene catabolizzato nella reazione

successiva dall'attività della GAPDH (*Glyceraldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase*). Questo enzima può essere soggetto ad inibizione, non ancora chiarita nelle modalità, da parte degli AGE-2, con riduzione della clearance della GA e favorendo in tal modo la formazione di altri TAGE. In condizioni di iperglicemia, oltre alla glicolisi, viene attivata la via dei polioli per eccesso di substrato; mentre, per quanto riguarda il metabolismo del fruttosio, questo ha una maggior importanza in organi periferici, soprattutto nel fegato nei periodi postprandiali per la presenza dell'enzima fruttochinasi. La neo-prodotta GA può giungere al cervello tramite la circolazione sistemica in quanto ha la capacità di superare la barriera ematoencefalica (99). La GA è in grado di indurre la formazione di specifici AGEs, denominati GA-AGEs, esibendo una forma di citotossicità che è stata caratterizzata in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y che involve l'inibizione della glicolisi e la concomitante induzione di GAPDH. In sostanza, la GA è in grado di provocare alterazioni metaboliche in cellule SH-SY5Y simili a quelle riscontrate nei neuroni con Malattia di Alzheimer (100).

L'alterazione del metabolismo energetico influenza profondamente le dinamiche cellulari a diversi livelli. A questo proposito va sottolineato come la diminuzione di ATP sia in grado di ridurre la capacità del neurone di mantenere i gradienti dei diversi ioni, tra cui il calcio. La riduzione dei livelli intracellulari di ATP può infatti causare un alterato funzionamento delle pompe e dei trasportatori che controllano l'omeostasi di questo ione, determinando un eccessivo ingresso di calcio nel citosol, evento a sua volta capace di innescare processi di morte cellulare che culminano in un deterioramento della funzionalità sinaptica e dei

processi cognitivi. Pertanto, esiste una stretta correlazione tra l'alterazione del metabolismo energetico e la disregolazione dell'omeostasi del calcio (101).

1.4.3 Regolazione dell'omeostasi del calcio e scambiatore sodio-calcio (*Sodium-Calcium Exchanger, NCX*)

Il calcio regola diversi processi cellulari ed una conoscenza della regolazione del calcio è fondamentale per comprendere le anomalie di cui il calcio è protagonista nella Malattia di Alzheimer (102).

L'ipotesi calcinistica della Malattia di Alzheimer fu proposta per la prima volta nel 1982 (103), sostenendo che una disregolazione dell'omeostasi del calcio sia tra i primi eventi che conducono alla patogenesi dell'Alzheimer e alle relative anomalie istologiche e funzionali presenti in un cervello Alzheimer (104).

La concentrazione citoplasmatica di calcio (~100 nM) è marcatamente inferiore rispetto a quella extracellulare (~1,2 mM) e a quella all'interno di organelli intracellulari, come il reticolo endoplasmatico e i lisosomi (0,5–1 mM) (105,106). Perciò, recettori, trasportatori e canali ionici svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento delle varie concentrazioni (104) (fig. 2).

Il principale deposito intracellulare del suddetto ione è il reticolo endoplasmatico. Questo, infatti, contiene elevate concentrazioni di proteine leganti il calcio, che portano la concentrazione totale di calcio fino a 1 mM, mentre la concentrazione di calcio libero è stata stimata tra le 100 e le 700 nM (107). Il calcio viene trasportato dal citoplasma all'interno del reticolo endoplasmatico dalla SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), una

pompa ATPasica. Ciò permette il mantenimento di bassi livelli di calcio citoplasmatico a riposo (102). Vi sono 5 isoforme di SERCA, codificate da 3 geni (108). L'attività di SERCA è modulata dalla fosforilazione (quindi dai livelli di ATP), dai ROS e dal calcio (109), ma anche la presenilina è stata proposta come modulatore della sua attività (110).

La fuoriuscita di calcio dal reticolo endoplasmatico è mediata da due canali ionici localizzati sulla sua membrana: il canale di rilascio attivato dall'inositolo trifosfato (IP3R) e i recettori rianodinici (*Ryanodine Receptors*, RyR). IP3R è un canale ionico attivato dall'inositolo trifosfato (IP3), un secondo messaggero implicato nella trasduzione di segnale generato da proteine G, ma ne regolano l'attività anche le concentrazioni di calcio citoplasmatica e intraluminale (104). In particolare, alte concentrazioni citoplasmatiche ne inibiscono l'attività, mentre basse concentrazioni la stimolano. Anche la fosforilazione da parte della protein chinasi A ne stimola l'attività, aumentandone la sensibilità all'IP3 (102).

Store-Operated Calcium Entry (SOCE) è il processo attraverso il quale la riduzione dei livelli di calcio all'interno del reticolo endoplasmatico stimola un influsso di calcio attraverso la membrana plasmatica (111). Le proteine STIM1 e 2 sono essenziali per il funzionamento di SOCE. Il loro funzionamento è piuttosto semplice: esse sono sensori del calcio e in seguito alla deplezione delle riserve di calcio all'interno del reticolo endoplasmatico si spostano in zone della membrana del reticolo endoplasmatico che fungono da giunzioni tra il reticolo stesso e la membrana plasmatica, dove reclutano la proteina ORAI (*Calcium Release-Activated Calcium Channel Protein 1*). Quest'ultima è un canale del calcio che, una volta aperto, permette il ripristino delle riserve di calcio.

Il calcio rilasciato dal reticolo endoplasmatico ha effetti intensi sui mitocondri (112), che, trovandosi in stretta vicinanza, lo recuperano rapidamente, attivando il complesso dell' α -chetoglutarato deidrogenasi (*alpha-KetoGlutarate DeHydrogenase Complex*, KGDHC) e il complesso della piruvato-deidrogenasi (*Pyruvate DeHydrogenase Complex*, PDHC) (102). La loro attivazione indotta dal calcio porta ad una aumentata produzione di NADH, ben al di là di quella necessaria per sostenere la fosforilazione ossidativa, con la conseguente ipersaturazione elettronica della catena respiratoria, responsabile di una produzione mitocondriale di ROS (102). I mitocondri, a loro volta, regolano i depositi endoplasmatici di calcio regolando il calcio citosolico e modulando l'attività delle varie proteine coinvolte nella regolazione del calcio tramite la produzione di ATP e ROS (112).

Tra le diverse molecole che partecipano al mantenimento dell'omeostasi del calcio, un ruolo di primaria importanza è svolto dallo scambiatore sodio-calcio (NCX). NCX è una proteina di membrana che opera con un meccanismo di antiporto ionico caratterizzato da una stechiometria di $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$, essenziale per generare segnali e mantenere l'omeostasi ionica in varie cellule. Lo scambio $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$ può avvenire sia in modalità *forward* (con la fuoriuscita di calcio) che in modalità *reverse* (con l'ingresso di calcio), sotto il controllo del potenziale di membrana e delle concentrazioni ioniche (113). Le tre isoforme (NCX1, NCX2 e NCX3) sono prodotti di tre geni distinti appartenenti alla famiglia genica SLC8 e le loro varianti di *splicing* sono espresse in numerose tipologie cellulari in maniera tessuto-specifica (114). Ad oggi sono state identificate 17 varianti di NCX1 e 5 di NCX3 prodotte tramite lo *splicing* alternativo, mentre non sono ancora state scoperte varianti di NCX2. Le varianti

emergono dalla combinazione di 6 esoni (A-F), puntualizzando che gli esoni A e B sono mutualmente esclusivi (115). Mentre NCX1 è universalmente espressa, le isoforme NCX2 e NCX3 sono state trovate principalmente nel cervello e nel muscolo striato (116).

NCX, che usa il gradiente del sodio per operare lo scambio ionico elettrogenico $3Na^+:1Ca^{2+}$, rappresenta un sistema ad alta capacità e bassa affinità, in grado di espellere grandi quantitativi di calcio citosolico in un tempo relativamente breve al fine di mantenere una corretta omeostasi tra i flussi in ingresso e in uscita del calcio (115).

La direzionalità del flusso netto di calcio dipende dalle concentrazioni citosoliche ed extracellulari di calcio e sodio e dal potenziale di membrana. A concentrazioni extracellulari di sodio e calcio fisse e con un potenziale di membrana a riposo pari a -80 mV, la forza elettrochimica che spinge lo scambio elettrogenico $3Na^+:1Ca^{2+}$ è pari a -32 mV, secondo la seguente formula:

$$E_{NCX} = 3E_{Na} - 2E_{Ca} = (RT/F) \ln\{([Na_o]^3[Ca_o])/([Na_i]^3[Ca_i])\}$$

Perciò, con potenziale di membrana a riposo, l'efflusso di calcio è la modalità di trasporto termodinamicamente favorevole, mentre quando E_{NCX} e E_m diventano uguali il flusso si inverte (115).

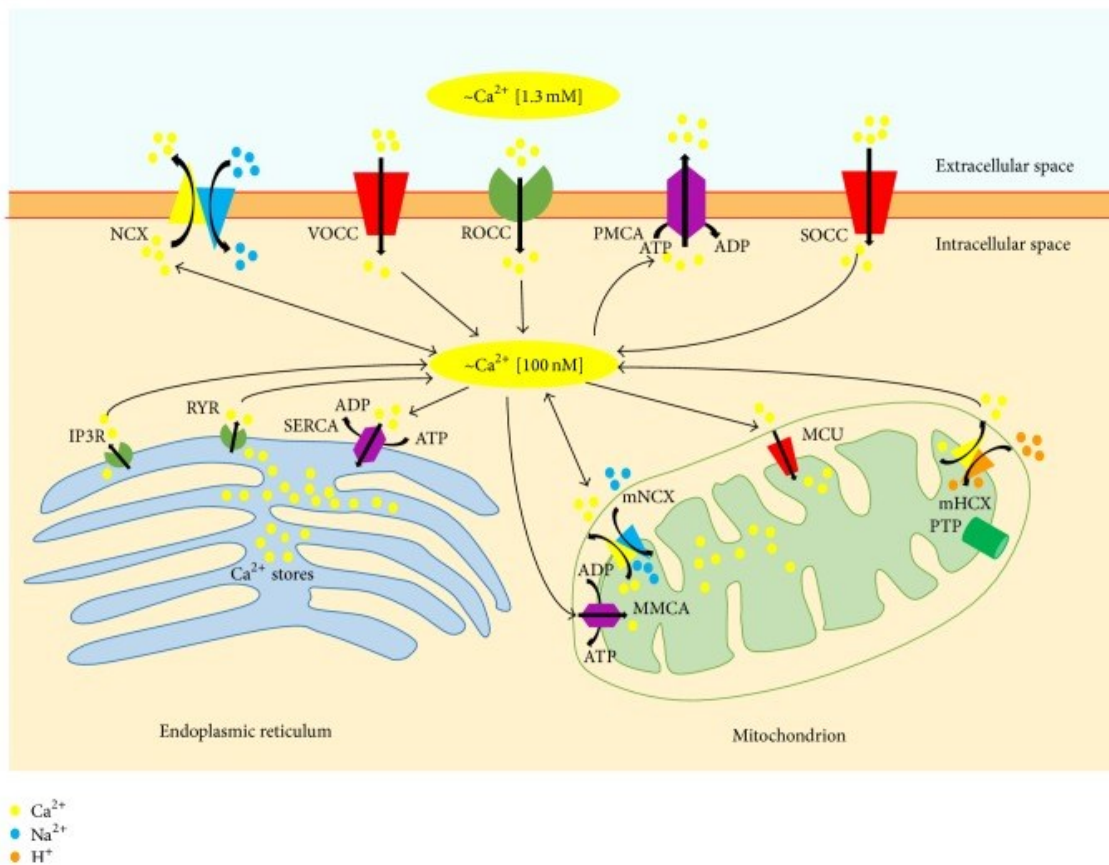


Figura 2: Sistemi di regolazione dell'omeostasi del calcio. Immagine tratta da (110).

L'attività di NCX è risultata fondamentale in diversi modelli sperimentali caratterizzati da alterazioni dell'omeostasi ionica e del metabolismo energetico; si è anche dimostrato come essa dipenda dallo specifico ambiente fisiopatologico in cui si trova ad operare. Per esempio, il *knock down* di NCX1 in un modello neuronale di ipossia/riossigenazione si è dimostrato essenziale nella protezione esercitata dal glutammato (117). Infatti, NCX1 colocalizza con un trasportatore di aminoacidi fondamentale per l'ingresso di glutammato nella cellula e nei mitocondri, *Excitatory Amino Acid Transporter 3* (EAAT3), coopera con esso per rendere disponibile il glutammato come substrato metabolico al fine di promuovere la produzione di ATP attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici (117). Risultati

simili sono stati ottenuti in un modello *in vitro* di ipossia/riossigenazione cardiaca, nonché in modelli di neurodegenerazione *in vitro* che riproducono le caratteristiche della Malattia di Alzheimer (118) e di Parkinson (119). In generale, si pensa che l'ingresso di glutammato nella cellula mediato da EAAT3 potrebbe indurre un aumento delle concentrazioni di sodio, il quale a sua volta stimolerebbe l'attività di NCX1 nel *reverse mode*, determinando un leggero aumento delle concentrazioni mitocondriali di calcio che attiverrebbero le deidrogenasi calcio-dipendenti del ciclo degli acidi tricarbossilici, portando in ultima analisi a un'augmentata produzione di ATP ed a un miglioramento della sopravvivenza cellulare (120).

Tutti i sistemi implicati nel metabolismo del calcio precedentemente argomentati subiscono una disregolazione nella Malattia di Alzheimer.

La fuoriuscita di calcio dal reticolo endoplasmatico è abnorme nei neuroni Alzheimer e sono stati proposti diversi meccanismi molecolari per spiegare questo fenomeno, molti dei quali hanno alla base una disfunzione delle preseniline (PS1 e PS2), il cui gene (quando mutato) è il principale determinante della forma familiare della Malattia di Alzheimer. Le preseniline sono espresse ubiquitariamente sulle membrane cellulari, incluse quelle del reticolo endoplasmatico dove formano il complesso catalitico della γ -secretasi responsabile del clivaggio di APP. Quando mutate alterano il tasso di produzione dei frammenti A β 42/A β 40 dal clivaggio di APP, ma determinano anche una disomeostasi del calcio. L'aumentato rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico da parte di Ip3R e RyR è stato attribuito alla loro aumentata espressione determinata dalle preseniline mutanti. Queste ultime, inoltre,

potrebbero anche sensitizzare Ip3R, determinando un effetto eccitatorio (121). Nel 2009 Stutzmann e colleghi hanno dimostrato che in un modello murino triplotransgenico di Alzheimer vi è un' aumentata espressione sia dell' mRNA che della proteina RyR2 (122) e nel 2012 hanno confermato la stessa scoperta in neuroni umani corticali e ippocampali di pazienti con *mild cognitive impairment* (123).

Un aumentato efflusso di calcio attraverso RyR è stato osservato anche in studi condotti su bilayer fosfolipidici planari e il fatto che questo rilascio venga antagonizzato dall' inibizione della NADPH ossidasi suggerisce che alla base del meccanismo vi sia implicato lo stress ossidativo (104).

Le preseniline sono indispensabili per il corretto funzionamento di SERCA; infatti, il loro silenziamento riduce la capacità di SERCA di sequestrare il calcio, mentre la loro mutazione ne accelera il sequestro (124). Inoltre, la sovraespressione di SERCA determina una più abbondante produzione di A β 40 (125).

Il perturbamento di SOCE, inteso come un ridotto ingresso di calcio nella cellula, è stato osservato in neuroni primari di topi sovraespressanti PS1 umana mutante e in fibroblasti di pazienti con la forma familiare di Malattia di Alzheimer (126,127). Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base del fenomeno in questione sono ancora oggetto di dibattito. La disfunzione di SOCE potrebbe derivare da un eccessivo riempimento di calcio del reticolo endoplasmatico o dalla riduzione dell' espressione delle proteine STIM1 e 2, essenziali per il suo corretto funzionamento (121). Infatti, la stessa γ -secretasi che si occupa del clivaggio di APP, è anche in grado di clivare STIM1, riducendone quindi la capacità di reclutare ORAI

(128). Le implicazioni fisiopatologiche di una riduzione di SOCE non sono ancora estensivamente studiate, ma diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che sia in grado di provocare morte neuronale e una riduzione della plasticità sinaptica (121).

L'attività mitocondriale è strettamente dipendente dal trasferimento di calcio dal reticolo endoplasmatico alla matrice mitocondriale. Un aumento di questo trasferimento promuove l'attività mitocondriale stessa, ma un eccesso di calcio sopprime la produzione di ATP e stimola la produzione di ROS e l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (121). L'eccesso di ROS attiva i canali RyR, aumentando il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico, che verrà sequestrato dai mitocondri dando il via ad un circolo vizioso, che porterà in ultima analisi alla morte neuronale per eccesso di ROS (129,130). Inoltre, il sovraccarico mitocondriale di calcio determina anche la formazione del poro di transizione della permeabilità mitocondriale, attraverso il quale il citocromo C viene rilasciato dal mitocondrio, avviando l'apoptosi (131).

A compromettere la regolazione del calcio nella Malattia di Alzheimer può contribuire anche NCX, la cui attività può essere alterata dalle interazioni che A β esercita sulla membrana plasmatica e sulla porzione idrofobica di NCX. Questa ipotesi è supportata dal fatto che le tre isoforme di NCX colocalizzano con A β (110). Tuttavia, va sottolineato che l'alterata espressione di NCX potrebbe rappresentare il tentativo della cellula di rispondere alla disregolazione del calcio provocata da A β (110). L'alterazione della funzione di NCX può essere dovuta anche agli effetti inibitori dei metaboliti risultanti dal processamento di APP (132) e dal fatto che NCX3 venga clivato dalla calpaina, stimolata da A β 42 (133). Infatti, il

clivaggio di NCX3 da parte della calpaina ne riduce l'attività prevenendo il legame dello stesso NCX3 al calcio (134) e l'attività della calpaina è aumentata in seguito all'applicazione di A β 1–42 (135) e alla sovraespressione di APP (136), dando forza all'ipotesi che l'aumentata attività della calpaina indotta da A β moduli la funzione di NCX3, ovvero che ne riduca la quota funzionalmente attiva (137). Di nota, lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato come una tale riduzione dell'attività di NCX3 sensibilizzi i neuroni alla tossicità indotta da A β . Tuttavia, tale sensibilizzazione è di piccola entità e il motivo di ciò potrebbe risiedere nella capacità dei neuroni di compensare in parte la perdita della funzione di NCX3 (133).

Molte delle disregolazioni dell'omeostasi del calcio sono presenti dalla nascita in modelli murini di Alzheimer (e forse anche nell'uomo), ma il cervello mette in atto processi di compensazione, i quali a loro volta inducono la fisiopatologia (102).

1.4.4 Specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*)

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono specie chimiche altamente reattive contenenti ossigeno (138). I ROS sono prodotti indesiderabili ma inevitabili della catena di trasporto degli elettroni dovuti a fughe di elettroni dai complessi I e III e si stima che i mitocondri siano responsabili di circa il 90% della loro produzione (139). Un'aumentata produzione di ROS o un'alterazione dell'equilibrio tra sistemi anti-ossidanti e pro-ossidanti possono portare a stress ossidativo. Il cervello è particolarmente sensibile al danno ossidativo per diversi motivi: ha un alto consumo di ossigeno, necessario per far fronte all'elevata spesa energetica che i suoi processi richiedono; vi è un'abbondanza di acidi grassi polinsaturi, i

quali sono facili prede dei radicali liberi; infine, il cervello ha una scarsa riserva antiossidante di cui può far uso (138). Il legame tra ROS e mitocondri non si limita solo al fatto che i secondi siano i principali produttori dei primi, poiché anche i mitocondri sono uno dei bersagli più importanti del danno ossidativo, che ne determina un deterioramento funzionale (138). Infatti, modificazioni ossidative degli enzimi coinvolti nel metabolismo glucidico determinano un inefficiente consumo di glucosio, con una conseguente ridotta produzione di ATP. Come evidenziato in precedenza, tutto ciò porta ad importanti conseguenze che impattano anche sull'omeostasi del calcio. Si instaura dunque un circolo vizioso, dal momento che, come già accennato, i mitocondri sono anche importanti attori nella regolazione dei livelli citoplasmatici di calcio, incrementi dei livelli citoplasmatici di tale ione vengono immediatamente “*bufferati*” dai mitocondri che provvedono a sequestrare il calcio in eccesso. Tuttavia, un eccessivo carico di calcio a livello mitocondriale, determina un'aumentata produzione di ROS, a cui consegue una ridotta sintesi di ATP (138) e l'apertura del poro di transizione mitocondriale, con induzione di fenomeni apoptotici e morte cellulare (140).

1.4.5 La Malattia di Alzheimer e i circoli viziosi che ne sostengono la patogenesi

Diverse linee di evidenza sostengono che lo stress ossidativo e la disregolazione del calcio possano convergere sulla formazione e deposizione di A β (141,142,143) e sulla fosforilazione di ptau (144,145). Per esempio, l'aumento dei biomarker dello stress ossidativo, quali l'idrossinonenale e il perossido di idrogeno, correlano con un aumento dell'espressione degli mRNA e dell'attività delle β - e γ -secretasi (146). Inoltre, è stato

riportato che i GA-AGEs possono incrementare l'espressione di APP e A β attraverso i ROS (147). L'alterazione dell'omeostasi del calcio, che può avvenire parallelamente allo stress ossidativo (144), potrebbe contribuire all'alterazione dei livelli di A β e ptau. A tal proposito, studi in vitro hanno dimostrato che il calcio può interagire direttamente con la β -secretasi, potenziandone l'attività proteolitica ed esacerbando di conseguenza la formazione di A β (148). Inoltre, un incremento prolungato dei livelli di calcio intracellulare porta all'attivazione di molte proteine calcio-sensibili, incluse le calpaine, che regolano il taglio proteolitico di APP e l'attività di chinasi coinvolte nella fosforilazione di tau, come la glicogeno sintasi chinasi 3 β e la chinasi 5 ciclino-dipendente (149). Quindi, lo stress ossidativo e la disomeostasi del calcio possono indurre le lesioni caratteristiche della Malattia di Alzheimer (144). D'altra parte, A β e ptau possono causare un sovraccarico di calcio attraverso diversi meccanismi. Per esempio, a livello della membrana, A β può formare dei canali permeabili al calcio e/o attivare diversi canali del calcio, determinando un massivo influsso di calcio dallo spazio extracellulare a quello citoplasmatico (148). Di conseguenza, i mitocondri possono captare grandi quantità di calcio in eccesso, fino ad un dannoso sovraccarico. A β può anche indurre il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico agendo su IP3R e RyR (150,151). Inoltre, è stato dimostrato che A β e ptau, tramite un'interazione diretta con alcune proteine mitocondriali, possono causare una disfunzione del mitocondrio stesso (150). Va aggiunto che A β è in grado di promuovere lo stress ossidativo tramite un'interazione diretta con metalli di transizione e la conseguente generazione di ROS, ossidazione di biomolecole e produzione di idrossinonenale e perossido

di idrogeno (152). In ultima analisi, l'abnorme metabolismo cellulare determina la produzione e l'accumulo di A β e ptau, i quali determinano un'esacerbazione della disfunzione mitocondriale e della conseguente generazione di ROS, propagando un circolo vizioso che alimenta la neurodegenerazione (153).

2 OBIETTIVO DELLA TESI

Le armi terapeutiche a nostra disposizione per la Malattia di Alzheimer sono, purtroppo, limitate a farmaci capaci solo di rallentare la progressione della sintomatologia, senza essere in grado di modificare il decorso della patologia. Ad oggi, i trial clinici volti a indagare l'efficacia di principi attivi agenti sui possibili meccanismi patogenetici alla base della Malattia di Alzheimer non hanno raggiunto gli obiettivi prefissati (154). Si rende pertanto necessario concentrare gli sforzi verso la comprensione di tali meccanismi patogenetici, al fine di poter identificare nuovi ed efficaci target terapeutici.

Il modello oggetto di studio in questo lavoro rispecchia in maniera soddisfacente molte delle alterazioni osservate nella Malattia di Alzheimer, tra cui l'instaurarsi di circoli viziosi che perpetuano e amplificano il danno neuronale. Il calcio, o meglio la sua disregolazione, risulta coinvolto nei suddetti circoli e, poiché è un messaggero fondamentale implicato in numerose funzioni neuronali, la correzione della sua disomeostasi potrebbe rivelarsi un efficace intervento terapeutico. Uno dei maggiori regolatori delle concentrazioni intracellulari di calcio è NCX, tuttavia la sua attività è complessa, anche in virtù dell'espressione tessuto-specifica delle sue diverse isoforme. Pertanto, non si potrà ragionare in termini di semplice inibizione o attivazione, ma di modulazione della sua attività, che dovrà tenere conto del diverso comportamento delle sue isoforme.

A tale scopo, in questo lavoro si è indagato il ruolo svolto da NCX3 nella mediazione del danno metabolico in un modello in vitro in grado di ricapitolare le principali caratteristiche molecolari della Malattia di Alzheimer. Nello specifico, si sono indagate le alterazioni

indotte dalla GA, un inibitore della glicolisi, in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y e gli effetti prodotti dall'inibizione di NCX3 e NCX1 nella modulazione del danno indotto da GA.

In particolare, in questo lavoro sono stati caratterizzati:

- Le alterazioni dei livelli di ATP, della vitalità cellulare, della funzionalità mitocondriale, della produzione di ROS mitocondriali e dei biomarcatori di Alzheimer derivanti dall'esposizione a GA.
- La reversibilità delle alterazioni cellulari indotte dalla GA in seguito a inibizione delle isoforme 3 ed 1 di NCX.
- L'alterazione dell'attività di NCX in seguito ad esposizione a GA e reversibilità di tale alterazione in seguito a inibizione di NCX3.
- L'alterazione dell'espressione di NCX3 in seguito ad esposizione a GA.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

La linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (CRL-2266). Le cellule SH-SY5Y sono state coltivate in monostrato in piastre di Petri (100 mm di diametro) utilizzando Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Corning, New York, NY, USA) supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina e sono state mantenute in un incubatore umidificato a 37° C in un'atmosfera al 5% di CO₂. Una settimana prima di eseguire gli esperimenti, le cellule sono state piastrate e differenziate in cellule neuronali mediante il trattamento con 10 µM di acido retinoico (*Retinoic Acid*, RA) (117). Il terreno di coltura contenente RA è stato sostituito ogni due giorni.

3.2 Modello sperimentale di Alzheimer

Per indurre alterazioni cellulari correlate all'Alzheimer, le cellule sono state esposte a GA, una sostanza in grado di inibire la glicolisi (120), alla concentrazione di 1 mM, per 24 ore in un incubatore umidificato a 37° C, in un'atmosfera al 5% di CO₂. Questo trattamento è in grado di indurre la formazione di AGEs e di alterare significativamente la respirazione mitocondriale, la glicolisi, la formazione di ROS (155) e i livelli di marcatori molecolari quali Aβ₄₂ e ptau (120).

3.3 Silenziamento di NCX1 e NCX3

Il silenziamento di NCX1 e NCX3 è stato eseguito con il kit di trasfezione HiPerfect (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore attraverso l'uso di FlexiTube siRNA for NCX1 e FlexiTube siRNA for NCX3. Il siRNA (*small interfering RNA*) validato ALLstars è stato usato come controllo negativo. La sequenza bersaglio di FlexiTube NCX1 siRNA è Hs_SLC8A1_9_ (5'-CAGGCCATCTTCTAAGACTGA-3'), mentre quella di FlexiTube NCX3 siRNA è Hs_SLC8A3_7 (5'- ACCATTGGTCTCAAAGATTCA-3'). Il protocollo di trasfezione è stato il seguente: le cellule SH-SY5Y (15000 cellule per pozzetto) sono state differenziate con RA alla concentrazione di 10 μ M in piastre da 96 pozzetti. Dopo 7 giorni, le cellule SH-SY5Y sono state incubate per 48 ore con 100 μ l di DMEM, 12 μ l di HiPerfect Transfections Reagents e 80 nM di siRNA (per ciascun pozzetto) (117). 24 ore dopo le cellule sono state sottoposte a specifico trattamento con GA.

3.4 Valutazione della vitalità cellulare

Il danno cellulare è stato valutato attraverso la misurazione dell'attività della lattato deidrogenasi (*lactate dehydrogenase*, LDH) rilasciata nel mezzo dal citosol delle cellule danneggiate. L'enzima lattato deidrogenasi è un enzima fisiologicamente presente all'interno delle cellule, dove catalizza la reazione di conversione del lattato in piruvato generando NADPH. In seguito ad un danno della parete cellulare la lattato deidrogenasi fuoriesce dal citosol al mezzo di coltura, dove la sua attività può essere quantificata sfruttando una seconda reazione che consuma il NADPH prodotto dalla lattato deidrogenasi

aumentando i livelli di assorbanza. Il mezzo di coltura è stato prelevato alla fine del protocollo GA e centrifugato a 250 x g per 10 minuti. In seguito, 100 ml di surnatante sono stati trasferiti in una piastra da 96 pozzetti e incubati con lo stesso volume di miscela di reagenti (la miscela diaforasi/NAD⁺ premiscelata con iodotetrazolio cloruro/lattato sodico (Roche Diagnostics, Monza, Italia) a temperatura ambiente al buio per 30 minuti. La LDH rilasciata dalle cellule danneggiate è stata valutata misurando l'assorbanza del campione a 490 nm in un lettore di piastre Victor Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) (120).

Il saggio bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) misura la vitalità cellulare attraverso la valutazione della capacità dei mitocondri di metabolizzare il sale di tetrazolio di colore giallo in cristalli viola insolubili di formazano. Le SH-SY5Y sono state piastrate in piastre da 12 pozzetti e alla fine del protocollo sperimentale sono state incubate con 0,5 ml di soluzione MTT (0,5 mg/ml in PBS) al buio, in un incubatore umidificato a 37° C, in un'atmosfera con 5% di CO₂. Dopo un'ora le cellule sono state lavate con PBS e i cristalli di formazano prodotti sono stati solubilizzati in 0,5 ml di DMSO. Una riduzione dell'attività mitocondriale determina una riduzione della produzione di formazano e di conseguenza dei valori di assorbanza. L'assorbanza è stata misurata a una lunghezza d'onda di 540 nm usando un lettore di piastre Victor Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) (119).

3.5 Saggio ATP

Il contenuto intracellulare di ATP è stato valutato usando il sistema luciferasi-luciferina disponibile in commercio (ATPlite, Perkin Elmer). Questo saggio sfrutta la reazione di ossidazione della luciferina catalizzata dalla luciferasi in presenza di ATP generando ossiluciferina in stato elettronicamente eccitato. L'ossiluciferina, ritornando allo stato di riposo, emette un fotone nello spettro giallo/verde (550-570 nm).

Le cellule SH-SY5Y sono state differenziate in piastre da 96 pozzetti con una densità di $1,5 \times 10^4$ per pozzetto. Dopo 7 giorni, il mezzo di differenziamento è stato rimosso e le cellule sono state sottoposte a protocollo sperimentale. Al termine di questo, l'emissione di luce proporzionale ai livelli di ATP è stata misurata con lettore di piastre Victor Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). È stata sfruttata una curva di calibrazione per convertire l'emissione di luce in nanomoli di ATP e quest'ultime sono state normalizzate al contenuto di proteine. Infine, è stata eseguita una normalizzazione al controllo (119).

3.6 Anticorpi

La proteina NCX3 è stata rilevata usando un anticorpo IgG murino policlonale disponibile in commercio (1:1000, Swant, Bellinzona, Svizzera) (156). Come controllo è stata usata la β -actina (1:5000; Sigma). Per esaminare l'espressione della forma fosforilata della proteina tau è stato utilizzato l'anticorpo anti-tau AT100 (1:100; questo anticorpo riconosce i residui di Thr 212 e Ser 214 fosforilate; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Per rilevare

A β 1-42 è stato utilizzato l'anticorpo anti- A β 1-42 12F4 (1:100; Biolegend, San Diego, SD, USA).

3.7 Western Blot

Le cellule SH-SY5Y differenziate sono state lisate usando un buffer di lisi contenente (in mM): 150 NaCl, 10 Tris-HCl (pH 7,4), 1 EDTA (pH 8,0), 1% SDS e una miscela di inibitori di proteasi (Roche Diagnostics). La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Bradford (Bio-Rad, Milano, Italia), usando l'albumina sierica bovina come standard. Campioni contenenti uguali quantità di proteine sono stati bolliti per 10 minuti in un tampone di caricamento (Laemmli 4x) con aggiunta di 2-mercaptoetanololo. Le proteine sono state poi sottoposte a elettroforesi in un gel di SDS-poliacrilammide e poi trasferite tramite corrente elettrica a una membrana di Polivinilidenefluoruro (Immobilion Transfer Membranes, Millipore Co., Bedford, MA, USA). Il blocco di legami non specifici è stato ottenuto ponendo la membrana in una soluzione diluita di latte in polvere al 5% in Tris-Buffered Saline (TBS) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente la membrana è stata incubata *overnight* a 4° C con l'appropriato anticorpo primario. Gli immunocomplessi sono stati rivelati tramite l'incubazione con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano (Santa Cruz, CA, USA) alla diluizione 1:1000, per un'ora a temperatura ambiente. Per rilevare gli anticorpi legati alla proteina di interesse è stato utilizzato un sistema di rilevamento di chemiluminescenza (Super Signal West Femto kit, Thermo Scientific, Milano, Italia). Le immagini sono state acquisite e salvate su un apparecchio ChemiDoc (Bio-Rad,

Milano, Italia). La densità delle bande è stata analizzata con il software di analisi Quantity One (Bio-Rad). La densità delle bande di NCX3 è stata normalizzata rispetto alla densità delle corrispondenti bande di β -actina (117).

3.8 Analisi dell'attività di NCX

Soluzioni

Ca-PSS contiene (in mM): 140 NaCl; 5 KCl; 1 MgCl₂; 10 glucosio; 2 CaCl₂ e 20 HEPES, tamponato a pH 7.4 con Tris. Na-PSS ha composizione identica tranne per il calcio, che non è presente, e per l'aggiunta di EDTA 0.1 mM. K-PSS contiene (in mM): 140 KCl; 1 MgCl₂; 10 glucosio; 0.1 CaCl₂ e 20 HEPES, tamponato a pH 7.4 con Tris.

Protocollo sperimentale

I livelli intracellulari di calcio sono stati misurati usando l'analisi di immagini video computerizzata a cellula singola con il sistema confocale LSM 510 (Carl Zeiss, Milano, Italia). Dopo il differenziamento su vetrini coprioggetto da 25 mm, le cellule SH-SY5Y sono state sottoposte a trattamento con GA. Successivamente, sono state caricate con la sonda fluorescente Fluo-4/AM 4 μ M (Molecular Probe, Eugene, OR) in Ca-PSS 0.08% acido pluronico (Molecular Probe) per 40 minuti al buio a temperatura ambiente. Fluo-4 è in grado di legare il calcio. Questo legame determina un'alterazione del suo spettro di fluorescenza. Nello specifico, il legame col calcio genera, in seguito all'eccitazione con laser a 480 nm, un incremento dell'intensità del segnale di fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 525 nm.

I vetrini coprioggetto sono stati poi lavati una volta con Na-PSS e trattati per 10 minuti con Tapsigargina 1 μM in Na-PSS. Dopo un ulteriore lavaggio, i vetrini coprioggetto sono stati posizionati in una camera a perfusione montata sul supporto di un microscopio Zeiss Axiovert 200 invertito. L'attività di NCX è stata valutata monitorando l'ingresso di Ca^{2+} via *reverse mode*, attraverso il passaggio da Na-PSS a K-PSS. Le soluzioni sono state cambiate con una pompa peristaltica e le immagini sono state acquisite ogni 5 s. Le cellule e le soluzioni di perfusione sono state mantenute a una temperatura di 37° C usando un supporto riscaldato e una camera riscaldata (PeCon GmbH). La luce di eccitazione è stata generata con un laser ad Argon a 488 nm e l'emissione è stata registrata in time-lapse a 505-530 nm. L'analisi dell'intensità della fluorescenza è stata eseguita offline dopo la fase di acquisizione delle immagini, calcolando la media dei valori di fluorescenza all'interno delle aree cellulari selezionate.

3.9 Valutazione della produzione mitocondriale di ROS

La valutazione specifica dei livelli mitocondriali di ROS è stata effettuata usando Mito-Tracker CM-H2XRos (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Le cellule sono state piastrate su vetrini e sottoposte a specifico trattamento. Al termine del protocollo sperimentale, le cellule sono state caricate con Mito-Tracker CM-H2XRos (300 nM) per 30 minuti a 37° C e poi lavate 3 volte con PBS. Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio confocale 510 (Carl Zeiss) equipaggiato con un sistema di rilevamento META. CM-H2XRos è stato eccitato a 560 ± 10 nm e le sue emissioni sono state misurate a $620 \pm$

20 nm. Le immagini sono state acquisite ogni 5 s e i livelli basali di ROS sono stati monitorati per circa 200 s. L'analisi dell'intensità della fluorescenza è stata effettuata offline dopo l'acquisizione delle immagini. I valori della fluorescenza sono stati riportati come percentuale dei valori del controllo.

3.10 Farmaci e sostanze chimiche

SN-6 (*2-[[4-[(4-Nitrophenyl)methoxy]phenyl]methyl]-4-thiazolidinecarboxylic acid ethyl ester*) è stato acquistato da Tocris. Tutte le altre sostanze chimiche, di grado analitico, sono state acquistate da Sigma.

3.11 Analisi dei dati

I dati sono presentati come media \pm errore standard. Valori $< 0,05$ sono stati considerati significativi. Per comparare due set di dati è stato usato il test t di Student. Per comparare gruppi multipli, i paragoni statistici sono stati effettuati tramite l'analisi della varianza ad una via (One-way ANOVA) seguita dal test post hoc di Dunnett. Le analisi statistiche sono state eseguite usando il software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

4 RISULTATI

4.1 Il bloccante farmacologico SN6 protegge dal danno indotto da GA

Secondo quanto riportato in letteratura, la disregolazione dell'omeostasi del calcio sembra essere correlata alle disfunzioni metaboliche che determinano l'insorgenza e la progressione della Malattia di Alzheimer. Per questo inizialmente è stato valutato il ruolo di NCX, uno dei principali determinanti del mantenimento dell'omeostasi del calcio, nel presente modello di danno cellulare indotto da GA.

A questo scopo, le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y differenziate con acido retinoico in uno stato neuronale (117) sono state trattate con GA alla concentrazione di 1 mM per 24 ore (118). Come atteso, l'esposizione a GA inficiava significativamente la produzione di ATP (118). È interessante notare che, in presenza di GA, il trattamento farmacologico con SN6 (3 μ M), un inibitore di NCX, era in grado di ripristinare completamente i livelli di ATP, mentre il farmaco da solo non influenzava lo stato energetico della cellula (fig. 3A). Sulla base di questo risultato, è stato valutato anche l'impatto sulla vitalità cellulare del ripristino dei livelli di ATP indotto dall' SN6. Come mostrato in fig. 3B, anche la vitalità cellulare, misurata come attività dell'enzima LDH nel mezzo di coltura, risultava compromessa dall'esposizione a GA. Mentre il solo trattamento con SN6 non mostrava modificazioni significative rispetto al controllo, esso esercitava effetti protettivi sulla vitalità cellulare quando somministrato insieme a GA, prevenendo il danno indotto da quest'ultima. Questi dati suggerivano un potenziale coinvolgimento di NCX nel danno indotto da GA.

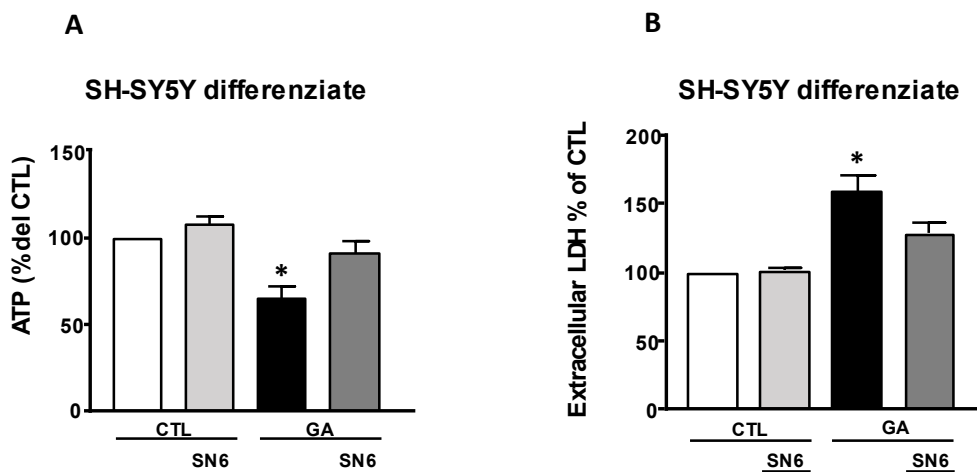


Figura 3. Effetto dell'inibitore SN6 su cellule SH-SY5Y differenziate trattate con GA. (A) Effetto dell'inibitore SN6 sulla produzione intracellulare di ATP. Il contenuto di ATP è espresso come percentuale del controllo. (B) Effetto di SN6 sulla vitalità cellulare. La vitalità cellulare è stata stimata misurando i livelli extracellulari di LDH. I livelli di LDH sono stati espressi come percentuale del controllo. Le cellule sono state trattate per 24 ore con GA e con SN6 alla concentrazione di 1 mM e 3 μM, rispettivamente. Le differenze statistiche sono state valutate usando l'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) seguita dal test post-hoc di Dunnett. (A) Ogni colonna rappresenta la media ± errore standard di n= 9 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, p < 0,001 rispetto al controllo (B) Ogni colonna rappresenta la media ± errore standard di n= 5 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, p < 0,05

CTL= controllo; GA= gliceraldeide 1 mM; SN6= 2-[[4-[(4-Nitrophenyl)methoxy]phenyl]methyl]-4-thiazolidinecarboxylic acid ethyl ester

4.2 Il silenziamento tramite RNA interference di specifiche isoforme di NCX

protegge dal danno metabolico indotto da GA

Per indagare quale isoforma di NCX fosse maggiormente coinvolta nel danno indotto da GA, è stato eseguito il silenziamento genico tramite siRNA delle isoforme NCX1 e NCX3. Queste due sono infatti le uniche isoforme di NCX espresse dalle cellule SH-SY5Y (117).

A questo scopo, le cellule SH-SY5Y differenziate con acido retinoico sono state sottoposte a specifico protocollo per il silenziamento genico tramite siRNA di NCX1 e NCX3 e in seguito sono state esposte a GA (1 mM) per 24 ore. Come mostrato in fig. 4, il blocco di entrambe le isoforme riportava i livelli cellulari di ATP, significativamente ridotti dall'esposizione alla GA, a valori simili a quelli di controllo. Lo stato energetico cellulare non veniva perturbato dal silenziamento di NCX1 né dal silenziamento di NCX3.

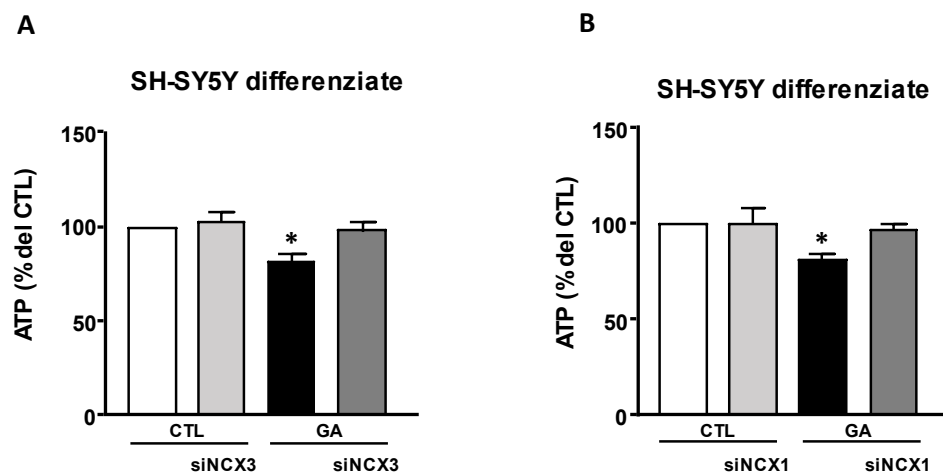


Figura 4: Effetto del silenziamento di NCX3 e NCX1 sui livelli intracellulari di ATP in SH-SY5Y differenziate esposte a GA. (A) Effetto del silenziamento di NCX3 sui livelli intracellulari di ATP. Il contenuto di ATP è

espresso come percentuale del controllo. (B) Effetto del silenziamento di NCX1 sui livelli intracellulari di ATP. Il contenuto di ATP è espresso come percentuale del controllo. Le differenze statistiche sono state valutate usando l'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) seguita dal test post-hoc di Dunnett. (A) Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di n= 5 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, $p < 0,05$ (B) Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di n= 4 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, $p < 0,05$ rispetto al controllo. siNCX3= silenziamento tramite RNA interference di NCX3; siNCX1= silenziamento tramite RNA interference di NCX1.

4.3 Il silenziamento tramite *RNA interference* di NCX3, ma non di NCX1, promuove la vitalità cellulare in cellule sottoposte a danno indotto da GA

Considerato l'effetto positivo del silenziamento di NCX1 e NCX3 sulla produzione di ATP drasticamente ridotta dal trattamento con GA, è stato successivamente valutato l'impatto del silenziamento sulla vitalità cellulare. A questo scopo, sono state misurate l'attività dell'enzima LDH nel mezzo di coltura e la capacità mitocondriale di convertire il composto MTT in sali di formazano (157,158). Come già descritto in fig. 3B, la vitalità cellulare risultava significativamente alterata in seguito all'esposizione a GA alla concentrazione 1 mM per 24 ore, come conseguenza del danno metabolico indotto dalla inibizione del processo glicolitico. Il preventivo silenziamento di NCX3 mostrava un effetto protettivo nei confronti del danno indotto da GA (fig. 5A, 5B), mentre il silenziamento di NCX1 non è stato in grado di migliorare significativamente la sopravvivenza cellulare (fig. 5C, 5D). Il silenziamento di entrambe le isoforme non mostrava effetti significativi sulla vitalità cellulare (fig. 5). Questi

dati indicavano un coinvolgimento selettivo della isoforma NCX3 nel danno metabolico indotto da GA.

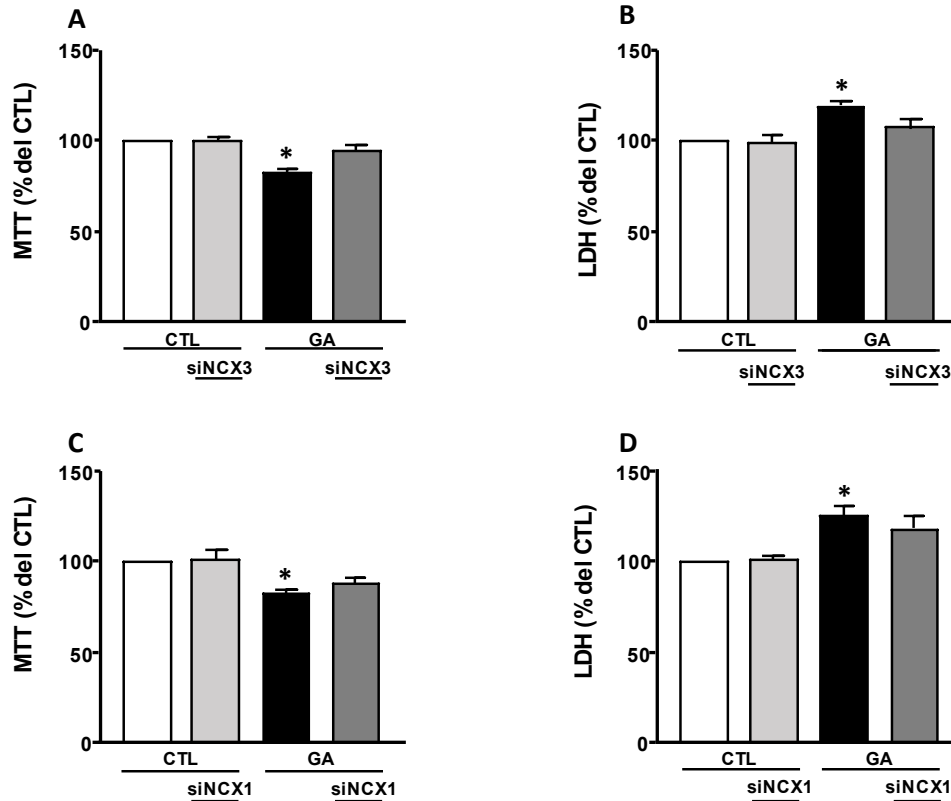


Figura 5: Effetto del silenziamento di NCX1 e NCX3 sulla vitalità cellulare in cellule SH-SY5Y differenziate esposte a GA. (A) Effetto del silenziamento di NCX3 sulla vitalità cellulare. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il saggio MTT. I livelli di MTT sono stati espressi come percentuale del controllo. (B) Effetto del silenziamento di NCX3 sulla vitalità cellulare. La vitalità cellulare è stata valutata misurando i livelli di LDH extracellulare. I livelli di LDH sono stati espressi come percentuale del controllo. (C) Effetto del silenziamento di NCX1 sulla vitalità cellulare. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il saggio MTT. I livelli di MTT sono stati espressi come percentuale del controllo. (D) Effetto del silenziamento di NCX1 sulla vitalità cellulare. La vitalità cellulare è stata valutata misurando i livelli di LDH extracellulare. I livelli di LDH sono stati espressi come percentuale del controllo. Le differenze statistiche sono state valutate usando l'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) seguita dal test post-hoc di Dunnett. (A) Ogni colonna rappresenta la media \pm errore

standard di n= 4 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, p < 0,001 (B) Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di n= 5 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto ai controlli, p < 0,05 (C) Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di n= 5 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto ai controlli, p < 0,05 (D) Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di n= 7 esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto ai controlli, p < 0,001.

4.4 Il danno metabolico indotto da GA riduce l'attività di NCX, ma il silenziamento di NCX3 ne riporta i livelli a valori simili a quelli di controllo

In seguito a danno metabolico indotto da GA, l'attività di NCX potrebbe risultare alterata a causa della carenza di ATP cellulare (101,120). Considerato quanto osservato in merito al coinvolgimento di NCX3 nel danno indotto da GA, si è ritenuto opportuno valutare se l'attività di NCX fosse influenzata dalle condizioni sperimentali precedentemente descritte. L'attività di NCX è stata valutata misurando il segnale di fluorescenza prodotto dall'ingresso di calcio sodio-dipendente in cellule caricate con Fluo-4.

Come descritto in fig. 6A, l'attività di NCX risultava significativamente ridotta dopo 24 ore di trattamento con GA alla concentrazione di 1 mM. È interessante notare che l'attività di NCX non risultava significativamente alterata dall'esposizione a GA in cellule SH-SY5Y sottoposte a silenziamento genico dell'isoforma 3 di NCX (fig. 6A). I livelli di fluorescenza non risultavano alterati dal solo silenziamento genico di NCX3.

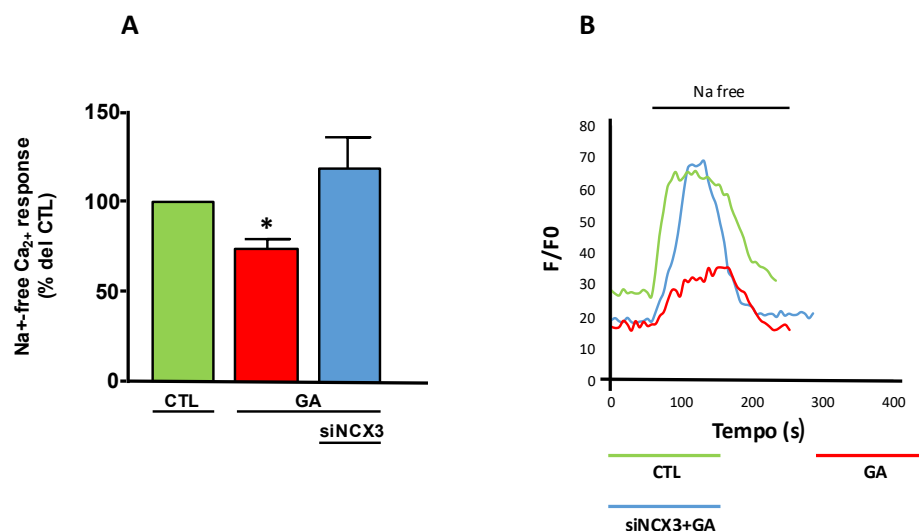


Figura 6: Effetto del silenziamento di NCX3 sull'attività di NCX in cellule SH-SY5Y differenziate esposte a GA.

(A) Effetto del silenziamento di NCX3 sull'attività di NCX. Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di $n = 4$ esperimenti eseguiti in triplicato. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, $p < 0,005$ (B) Singole tracce di registrazione rappresentative della risposta del calcio alla sostituzione della soluzione Ca-PSS con Na-PSS in condizioni fisiologiche (linea verde), in seguito a somministrazione di GA (1 mM) per 24 ore (linea rossa) e in seguito a silenziamento di NCX3 e somministrazione di GA (1 mM) per 24 ore (linea azzurra).

4.5 L'insulto metabolico provocato dalla somministrazione di GA riduce

l'espressione dell'isoforma 3 dello scambiatore sodio-calcio

Considerato quanto osservato negli esperimenti volti a valutare l'attività di NCX e lo specifico coinvolgimento di NCX3 nel danno indotto da GA, ci si è chiesti se tali effetti potessero essere influenzati da una eventuale modificazione dell'espressione proteica di NCX3.

A tal proposito, è stata valutata l'espressione dell'isoforma 3 di NCX tramite l'uso della tecnica biochimica del western blot.

Come mostrato in fig. 7, l'espressione di NCX3 risultava significativamente ridotta dal trattamento con GA.

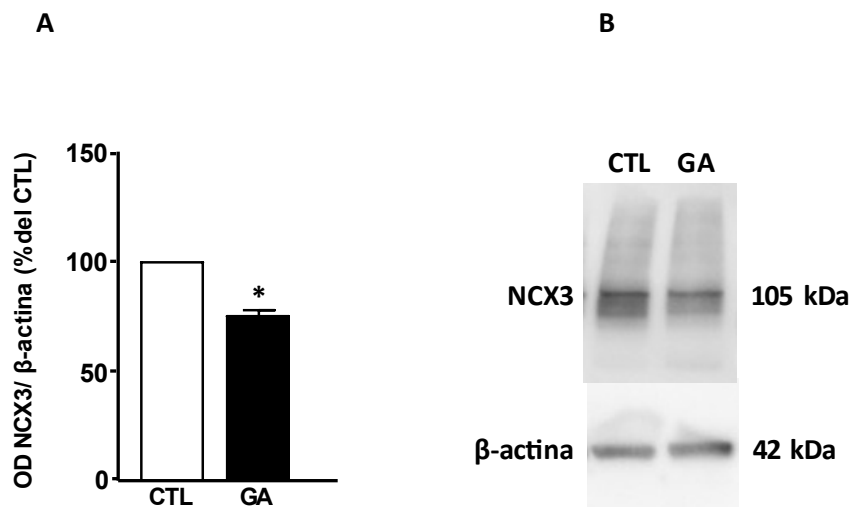


Figura 7: Effetto dell'esposizione a GA in cellule SH-SY5Y differenziate sull'espressione di NCX3.

(A) L'espressione di NCX3 è stata valutata tramite densitometria quantitativa di immagini western blot. Come controllo di caricamento è stata usata la β -actina. I valori di densitometria ottica sono stati normalizzati rispetto alla β -actina ed espressi come percentuale del controllo. Le differenze statistiche sono state valutate usando il test t di Student. Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di n= 5 esperimenti. * Significativo rispetto al controllo ($p < 0,0001$ rispetto al controllo). (B) Immagini western blot rappresentative dell'espressione di NCX3 in seguito all'esposizione a GA in cellule SH-SY5Y differenziate.

4.6 Il silenziamento di NCX3 riduce significativamente i livelli di ROS indotti dall'esposizione a GA

È stato dimostrato che le alterazioni del metabolismo energetico e la disomeostasi del calcio possono aumentare la produzione mitocondriale di ROS (101,159). Considerato che nel presente modello sperimentale di danno metabolico si è osservata un'alterazione dell'attività e dell'espressione di sistemi implicati nel controllo dell'omeostasi del calcio, è stata valutata la generazione di ROS in seguito al silenziamento genico di NCX3.

Come atteso, l'esposizione a GA aumentava significativamente i livelli di ROS rispetto al controllo (fig. 8A). Il silenziamento di NCX3 riportava i livelli di ROS a valori simili a quelli di controllo, revertendo in maniera completa la produzione di ROS indotta da GA.

Il solo silenziamento genico di NCX3 non modificava significativamente i livelli di ROS in condizioni di controllo.

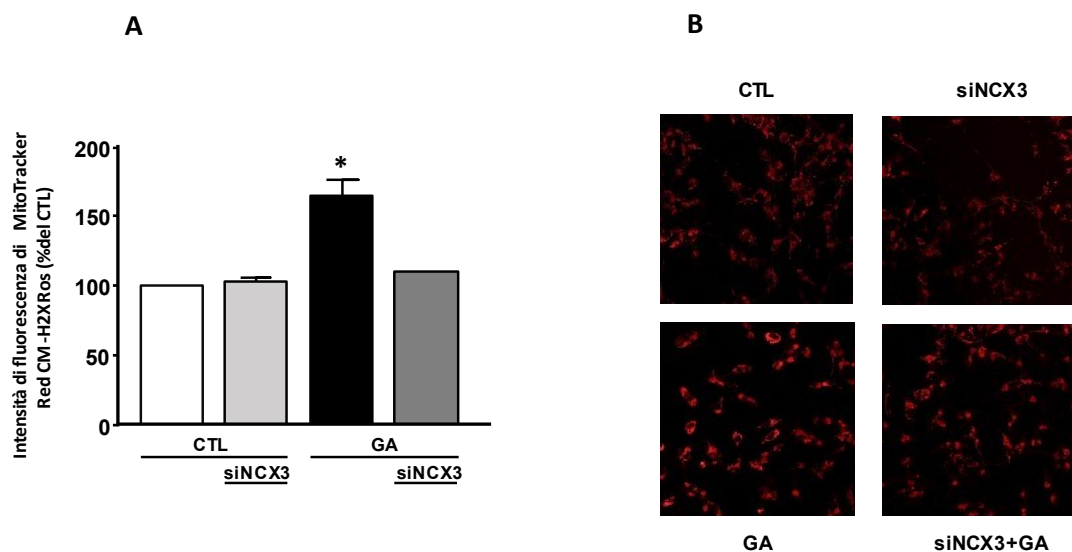


Figura 8: Effetto del silenziamento di NCX3 sulla produzione di ROS mitocondriali in cellule SH-SY5Y differenziate esposte a GA. (A) Analisi quantitativa della fluorescenza MitoTracker Red CM-H2XRos in SH-SY5Y esposte a GA (1 mM) per 24 ore in seguito a silenziamento di NCX3. (B) Immagini rappresentative dei ROS mitocondriali con fluorescenza MitoTracker Red CM-H2XRos. La fluorescenza di MitoTracker Red CM-H2XRos correla con i livelli di ROS mitocondriali. (A) La fluorescenza MitoTracker Red CM-H2XRos è espressa come percentuale rispetto al controllo. Le differenze statistiche sono state valutate usando l'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) seguita dal test post-hoc di Dunnett. Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di $n=3$ esperimenti.

* Significativo rispetto a tutti i gruppi, $p < 0,001$ rispetto al controllo.

4.7 Il silenziamento di NCX3 previene l'incremento dei livelli del marker A β 1-42

È già stato dimostrato che l'esposizione a GA di cellule SH-SY5Y differenziate con RA induce un incremento dei livelli di A β 1-42 (118). Pertanto, si è indagato l'effetto del silenziamento di NCX3 sulla deposizione di A β 1-42.

Come mostrato in fig. 9A, è stato confermato l'incremento della deposizione di A β 1-42 in seguito a esposizione a GA alla concentrazione di 1 mM per 24 ore. Di nota, il preventivo silenziamento di NCX3 riportava i livelli di A β 1-42 a valori simili a quelli di controllo, mostrando un chiaro effetto protettivo.

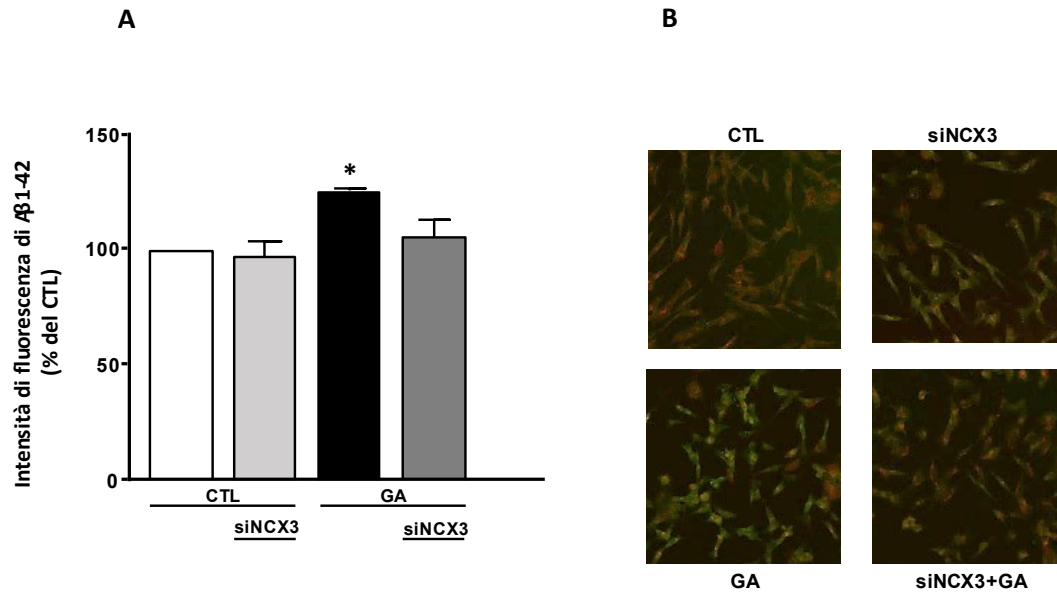


Figura 9: Effetto del silenziamento di NCX3 sui livelli di A β 1-42 in seguito all'esposizione a GA in cellule SH-SY5Y. (A) Per valutare l'espressione di A β 1-42 in cellule SH-SY5Y esposte a GA (1 mM) per 24 ore è stata effettuata l'analisi quantitativa dell'immunofluorescenza con l'anticorpo anti-A β 1-42 12F4. (B) Immagini rappresentative dell'espressione di A β 1-42 ottenute tramite immunofluorescenza in seguito all'applicazione dell'anticorpo anti-A β 1-42 12F4. (A) La fluorescenza anti-A β 1-42 12F4 è espressa come percentuale rispetto al controllo. Le differenze statistiche sono state valutate usando l'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) seguita dal test post-hoc di Dunnett. Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di n= 4 esperimenti. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, p < 0,05 rispetto al controllo.

4.8 Il silenziamento di NCX3 previene l'incremento dei livelli del marker ptau

La formazione dei grovigli neurofibrillari composti dalla forma fosforilata della proteina tau è, insieme alla formazione di A β 1-42, uno degli eventi patogenetici fondamentali della Malattia di Alzheimer. Pertanto, si è indagato l'effetto del silenziamento di NCX3 sui livelli intracellulari di ptau, i quali erano già stati dimostrati essere aumentati in seguito a esposizione a GA 1 mM per 24 ore (118).

Come mostrato in fig. 10A, è stato confermato che i livelli intracellulari di ptau subiscono un incremento significativo in seguito a trattamento con GA; tuttavia, il silenziamento di NCX3 ripristinava i livelli a valori simili a quelli del controllo.

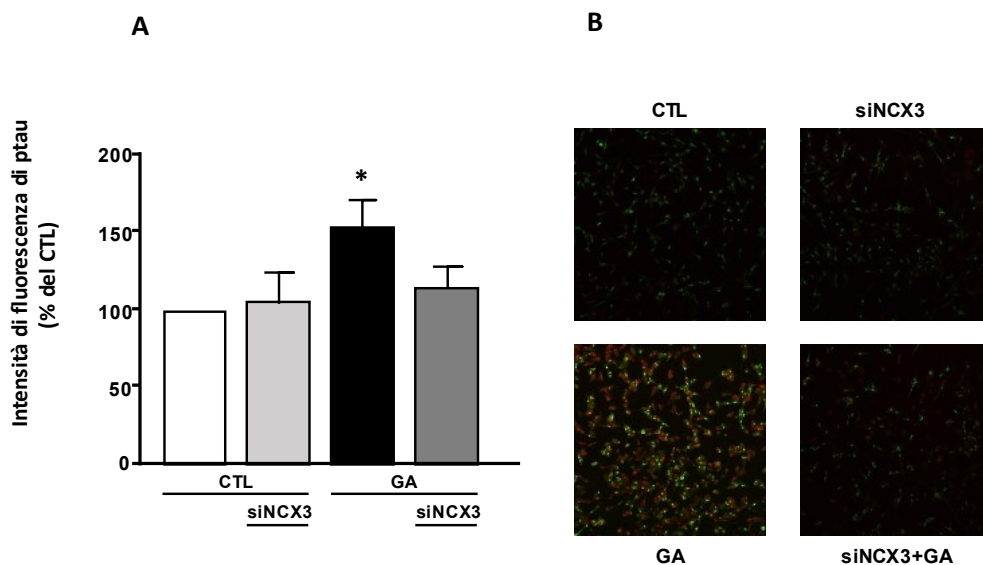


Figura 10: Effetto del silenziamento di NCX3 sui livelli di ptau in seguito all'esposizione a GA in cellule SH-SY5Y.

(A) Per valutare l'espressione di ptau in cellule SH-SY5Y esposte a GA (1 mM) per 24 ore è stata effettuata l'analisi quantitativa dell'immunofluorescenza in seguito all'applicazione dell'anticorpo anti-tau AT100. (B) Immagini rappresentative dell'espressione di ptau ottenute tramite immunofluorescenza con l'anticorpo

l'anticorpo anti-tau AT100. (A) La fluorescenza anti-tau AT100 è espressa come percentuale rispetto al controllo. Le differenze statistiche sono state valutate usando l'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) seguita dal test post-hoc di Dunnett. Ogni colonna rappresenta la media \pm errore standard di $n=3$ esperimenti. * Significativo rispetto a tutti i gruppi, $p < 0,05$ rispetto al controllo.

5 DISCUSSIONE

Il modello sperimentale utilizzato in questo lavoro si basa sull'esposizione di cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y differenziate con acido retinoico verso un fenotipo neuronale alla GA, un inibitore della glicolisi (117). Attraverso l'inibizione del processo glicolitico, la GA è in grado di causare uno stato ipometabolico caratterizzato da una ridotta produzione di ATP, come è stato dimostrato in questo lavoro e in altri precedenti (118,160). Questa è una condizione che predispone allo sviluppo ed alla progressione del danno neuronale che caratterizza la Malattia di Alzheimer. Infatti, come già osservato in altri studi, la GA promuove la produzione di ROS mitocondriali, determinando uno stato di stress ossidativo, e, in linea con quanto riportato in letteratura, aumenta i livelli di A β e ptau, due marker fondamentali della Malattia di Alzheimer (118,160). In ultima analisi, quindi, la GA induce alterazioni simili a quelle riscontrate nelle prime fasi della patogenesi della Malattia di Alzheimer (118,160).

Nello specifico, nel presente lavoro è stata osservata una riduzione della produzione di ATP con conseguente riduzione della vitalità cellulare e aumentata genesi di ROS in seguito all'esposizione a GA. Inoltre, la GA è stata in grado di indurre un incremento dei biomarcatori A β e ptau. Queste alterazioni sono state ripristinate per effetto del silenziamento genico di NCX3, mentre il silenziamento di NCX1 è stato capace di ristabilire la produzione di ATP, ma non la vitalità cellulare. È stata indagata anche l'attività di NCX, che si è rivelata ridotta nel modello sperimentale precedentemente descritto, ma è stata

anch'essa ripristinata in seguito a silenziamento di NCX3. Infine, la GA ha provocato una riduzione dell'espressione di NCX3.

Poiché l'ATP è fondamentale per il corretto funzionamento di pompe ioniche e trasportatori, una riduzione dei suoi livelli comporta necessariamente l'incapacità della cellula di mantenere i corretti gradienti ionici (101). Il calcio è un messaggero fondamentale, implicato nella regolazione dei diversi *pathway* intracellulari (161). Pertanto, una sua disregolazione implica anche una disregolazione dei vari processi che da esso vengono governati.

È stato dimostrato come la GA sia in grado di perturbare lo stato ossidativo cellulare (118,162) e dati preliminari mostrano che sia capace di ridurre l'attività della superossido dismutasi (SOD), un enzima che opera un'azione antiossidante fondamentale sul bilancio ossidativo. Numerose evidenze sperimentali dimostrano che lo stress ossidativo sia in grado di alterare l'attività di diversi sistemi implicati nella regolazione dell'omeostasi del calcio (163). In accordo con questi studi, dati preliminari sembrano indicare che l'esposizione a GA induca un aumento dei livelli citoplasmatici di calcio; ciò perturba l'omeostasi del calcio mitocondriale a causa della attività di *buffering* del calcio propria di tali organelli. Un rialzo moderato dei livelli mitocondriali di calcio determina un potenziamento della produzione di ATP, ma un incremento eccessivo sembra essere alla base del collasso del potenziale di membrana mitocondriale (dati preliminari), riduce l'efficienza della catena di trasporto degli elettroni (e quindi della produzione di ATP), comporta l'accentuazione della formazione di ROS e, tramite l'attivazione del poro di transizione della permeabilità

mitocondriale, avvia una cascata di eventi che culminano con la morte cellulare (73). Inoltre, l'aumentata genesi di ROS potrebbe inficiare ulteriormente la produzione di ATP; infatti, modificazioni ossidative di enzimi coinvolti nella glicolisi e nella catena respiratoria sono alla base dell'inefficiente consumo di glucosio nella Malattia di Alzheimer (101).

La riduzione della vitalità cellulare osservata in questo modello sperimentale potrebbe essere l'effetto di un insieme concomitante di fattori, tra cui: la riduzione della produzione di ATP, lo stress ossidativo causato dall'aumentata produzione di ROS mitocondriali, un eccessivo aumento dei livelli citoplasmatici di calcio in grado di attivare *pathway* di morte cellulare coinvolgenti il mitocondrio (101) e un incremento dei livelli di A β e ptau. Infatti, numerose evidenze concordano nell'affermare che lo stress ossidativo e la disomeostasi del calcio convergano sulla abnorme formazione e deposizione di A β e sull'iperfosforilazione di tau (164). Per esempio, proprio attraverso i ROS, gli AGEs indotti dalla GA possono incrementare l'espressione di APP e A β . Inoltre, studi in vitro hanno dimostrato che il calcio è in grado di interagire direttamente con le β -secretasi, che ricordiamo essere le secretasi responsabili del taglio amiloidogenico di APP e un innalzamento duraturo dei livelli citoplasmatici di calcio determina l'attivazione di numerosi enzimi calcio-dipendenti, tra cui le calpaine, importanti regolatrici del clivaggio di APP e dell'attività di numerose chinasi, come la glicogeno sintasi chinasi e la chinasi 5 ciclina-dipendente, entrambe in grado di stimolare la fosforilazione di tau.

Va sottolineato che A β sia capace di indurre a sua volta un incremento della concentrazione citoplasmatica di calcio tramite l'interazione con canali del calcio (165,166), la formazione

di canali ionici ad esso permeabili (167,168) e l'apertura di IP3R e RyR (150,169,170). Questo, come già accennato, causa l'ingresso di un eccessivo quantitativo di calcio all'interno del mitocondrio, le cui proteine sono, inoltre, bersaglio di un'interazione diretta da parte di A β e ptau (171). Tutto ciò determina una grave disfunzione mitocondriale. Per di più, è stato dimostrato come A β sia in grado di accentuare la generazione di ROS (73,171), tramite un'interazione diretta con varie proteine mitocondriali, inclusi gli enzimi della catena di trasporto degli elettroni (172,173).

Gli eventi descritti generano quindi un circolo vizioso da cui emerge un attore fondamentale, ovvero il calcio. Come descritto nell'Introduzione, la sua regolazione dipende da un network vasto e complicato di interazioni tra diversi trasportatori e canali. Fondamentale è l'attività di NCX, che è stata indagata in questo lavoro.

I risultati ottenuti dimostrano che la produzione di ATP nel modello di Alzheimer precedentemente descritto, era ripristinata dall'inibizione di NCX, sia che questa venisse indotta farmacologicamente che tramite la tecnica dell'*RNA interference*, indifferentemente da quale isoforma venisse silenziata. Tuttavia, non si può dire lo stesso della vitalità cellulare, che mostrava un comportamento isoforma-specifico. Infatti, l'utilizzo dell'inibitore farmacologico SN6 e il silenziamento genico di NCX3, ma non di NCX1, inducevano un significativo miglioramento della vitalità cellulare. Ciò suggeriva che a mediare il danno metabolico indotto dalla GA fosse l'isoforma 3 di NCX.

Per indagare il motivo di questa protezione è stata valutata l'attività di NCX. Complessivamente, questa risultava significativamente ridotta in seguito all'esposizione a

GA, probabilmente a causa della riduzione dei livelli di ATP (118) causati dall'insulto metabolico indotto dalla GA stessa. Tuttavia, dallo studio della letteratura si evince che anche lo stress ossidativo sia un possibile responsabile del calo dell'attività di NCX; infatti, NCX è soggetto ad una modulazione ad opera sia di molecole ossidanti che di composti antiossidanti (174) e questi ultimi possono variare la composizione della membrana fosfolipidica, che a sua volta è in grado di influenzare l'attività di NCX (175).

Poiché il corretto funzionamento di NCX è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi del calcio, è probabile che l'alterata funzionalità del trasportatore osservata in questo modello sperimentale si ripercuota, tramite una disregolazione del calcio, sulla generazione di ROS e su un'alterazione dei livelli di A β e ptau.

Dallo studio della attività di NCX è emerso che il blocco dell'isoforma 3 dello stesso era in grado di ristabilire livelli di attività, ripristinandola a valori paragonabili a quelli di controllo. È possibile che il blocco di NCX3 possa favorire un aumento compensatorio dell'attività di NCX1, in grado a sua volta di ripristinare l'omeostasi del calcio, interrompendo così il circolo vizioso che lo vede protagonista, ovvero permettendo la riduzione dei livelli citoplasmatici e, di conseguenza, mitocondriali del calcio, con successiva ripresa della produzione di ATP e calo della generazione di ROS, come osservato in questo lavoro e in accordo con la letteratura, che mostra come NCX1 svolga un ruolo di supporto fondamentale anche in modelli sperimentali di ipossia/riossigenazione (117) e Malattia di Parkinson (119), nonché nello stesso modello di danno neuronale indotto dalla GA in neuroni corticali di ratto (118). In tutti i suddetti modelli sperimentali, l'attività di NCX1 è necessaria a sostenere il

metabolismo energetico, in particolare la produzione di ATP indotta da glutammato. Nel contesto specifico del danno neuronale indotto da GA, la presenza di NCX1 favorisce l'utilizzo metabolico del glutammato, migliorando significativamente la vitalità cellulare, la produzione dei livelli di ATP, parallelamente alla riduzione dei livelli di ROS, A β e ptau (118,176,177).

La letteratura è concorde nell'affermare che le alterazioni metaboliche siano responsabili del processamento di APP verso vie amiloidogeniche, con successiva formazione di peptidi amiloidi tossici (178,179,180) e dell'iperfosforilazione di tau (181). Inoltre, è stato ipotizzato che sia proprio la riduzione di ATP intracellulare a favorire lo *switch* dalla via non amiloidogenica a quella amiloidogenica (118). Perciò, è possibile che il ripristino delle concentrazioni intracellulari di ATP provocato dal silenziamento di NCX3 influenzi la fosforilazione di tau e sia, almeno in parte, responsabile del calo dei livelli di A β attraverso l'induzione del processamento non amiloidogenico di APP.

È interessante osservare che nel modello proposto anche l'espressione dell'isoforma 3 di NCX veniva ridotta. Questa evidenza sembra essere in contrasto con l'osservazione che un'"ulteriore" riduzione della sua espressione attraverso la tecnica dell'*RNA interference* sia protettiva verso il danno indotto da GA. Tuttavia, possiamo ipotizzare che la riduzione dell'espressione di NCX3 sia un meccanismo di protezione messo in atto dalla cellula stessa nel tentativo di ridurre il danno metabolico indotto da GA e mediato da NCX3.

Poiché il modello in questione è basato su cellule SH-SY5Y differenziate con acido retinoico verso un fenotipo neuronale, non è stato possibile indagare il coinvolgimento dell'isoforma

2 di NCX (117). NCX2, infatti, non è espresso da queste cellule (182) e la sua assenza è uno dei limiti principali di questo modello. Occorrono pertanto nuovi esperimenti volti a studiarne l'implicazione. Inoltre, il modello utilizzato in questo lavoro prende in considerazione solo la componente neuronale; perciò, sarà utile in futuro allestire co-culture di neuroni e astrociti in modo da studiare le relazioni che intercorrono tra di essi.

Conclusioni

In conclusione, questo lavoro mostra come, in un modello *in vitro* di Malattia di Alzheimer basato sull'induzione di un danno metabolico attraverso l'esposizione a GA, l'inibizione di NCX3 sia in grado di arrestare la progressione del danno. In particolare, l'inibizione di NCX3 sembra in grado di migliorare la vitalità cellulare attraverso il ripristino dei livelli di ATP e la riduzione della produzione di ROS mitocondriali, eventi che sono accompagnati da una riduzione dei livelli di A β e ptau. Di fatto, viene spezzato il circolo vizioso che collega tra loro i deficit metabolici, la disomeostasi del calcio, la produzione di ROS e l'accumulo di A β e ptau, permettendo alla cellula di ristabilire la corretta omeostasi dei vari processi cellulari. Questi risultati potrebbero aprire la strada a nuovi approcci terapeutici per la Malattia di Alzheimer basati sul ripristino dell'omeostasi del calcio attraverso la modulazione dell'attività delle varie isoforme di NCX.

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va al Prof. Salvatore Amoroso, senza il cui supporto niente di tutto questo sarebbe stato possibile.

Un vivo e caloroso ringraziamento va alla Prof.ssa Simona Magi, Relatrice e Virgilio al mio Dante nella selva oscura. Non si è mai risparmiata, ha sempre avuto parole di conforto e di incoraggiamento, in ogni momento mi ha mostrato pazienza e fiducia. Il suo impegno e il suo temperamento sono stati fonti di ispirazione per me. Le parole non sono capaci di convogliare la gratitudine e l'affetto che provo.

Un vibrante ringraziamento va al Prof. Vincenzo Lariccia, Maestro di tavola e di vita (anche di un poco di neurobiologia, ma soprattutto di vita). La sua sincerità e la sua allegria mi hanno fatto sentire a casa, mentre le nostre discussioni hanno permesso anche a un sopravvissuto come me di arrancare fino alla laurea.

Un sincero ringraziamento va a Gerardo Galeazzi, la cui ospitalità è meritatamente leggendaria. Il lavoro è lavoro, ma tu sei sempre andato ben oltre, senza nessuna riserva.

Un sentito ringraziamento va a Silvia e Alessandra, sul cui infaticabile supporto si è fondata questa tesi. Mi avete insegnato tutto ciò che so della vita in laboratorio e siete state la mia guida in questa esperienza.

Un caldo ringraziamento va agli amici tutti, non pensiate che questo traguardo mi faccia dimenticare cosa sia veramente importante nella vita, perché lo sappiamo tutti che l'importante è...

Un affettuoso ringraziamento va alla mia famiglia. Un vecchio detto dice che si scelgono gli amici, ma non la famiglia. Io non avrei scelto altri che voi.

Un fugace ringraziamento va al lettore manzoniano, il tuo pensiero mi ha donato perseveranza anche nei momenti di stanchezza.

L'ultimo e il più importante ringraziamento va a te, che mi hai sempre apprezzato, che mi hai donato forza e coraggio senza chiedere nulla in cambio, il tuo affetto mi ha scaldato il cuore nei momenti più difficili e lo ha reso rovente nei momenti più belli. Non ho mai creduto che sarei stato così fortunato da trovare la persona perfetta per stare al mio fianco. Grazie a te, so cosa significhi amare ed essere amato.

"I feel thin, sort of stretched, like butter scraped over too much bread. I need a holiday, a very long holiday."

Bilbo Baggins

Bibliografia

1. *Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimer's Association. 2017.
2. *World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction an Analysis of Protective and Modifiable Factors*. Prince M, A. E. 2014.
3. *Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology*. Robinson M, Lee BY, Hanes FT. 1 Jan 2017.
4. *Addressing Unmet Needs in Alzheimer Disease: Implications of Delayed Diagnosis and Examining New and Emerging Therapies*. *Ajmc*. August 2020, The American Journal of Managed Care, Vol. 26.
5. *Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention*. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. 2009.
6. *Alzheimer's disease*. Blennow K., de Leon MJ., Zetterberg H. 368:387–403, 2006, *Lancet*.
7. *Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease*. Green RC, Cupples LA, Go R, Benke KS, Edeki T, Griffith PA, Williams M, Hipps Y, Graff-Radford N, Bachman D, Farrer LA. 287:329–336, 2002, *JAMA*.
8. *The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management*. Atri, Alireza. Volume 103, Issue 2, Pages 263-293, 2019, *Medical Clinics of North America*.
9. *Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus*. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve R. 1987, *Science*.
10. *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da S. 1995, *Nature*.
11. *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus*. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. 1995, *Science*.
12. *Risk and protective effects of the APOE gene towards Alzheimer's disease in the Kungsholmen project: variation by age and sex*. Qiu C, Kivipelto M, Aguero-Torres H, Winblad B, Fratiglioni L. 75:828–833, 2004, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
13. *Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies*. Fratiglioni L, Wang HX. 113:117–120, 2000, *Behav Brain Res*.

14. *Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies.* Anstey KJ, von Sanden C, Salim A, O'Kearney R. 166:367–378, 2007, Am J Epidemiol.
15. *Smoking, dementia and cognitive decline in the elderly, a systematic review.* Peters R, Poulter R, Warner J, Beckett N, Burch L, Bulpitt C. 8:36, 2008, BMC Geriatr.
16. *Alcohol drinking in middle age and subsequent risk of mild cognitive impairment and dementia in old age: a prospective population based study.* Anttila T., Helkala EL., Viitanen M., et al. 329:539, 2004, BMJ.
17. *Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease.* Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, Kåreholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. 62:1556–1560, 2005, Arch Neurol.
18. *Body mass index and incidence of dementia: the PAQUID study.* Nourhashémi F, Deschamps V, Larrieu S, Letenneur L, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. 60:117–119, 2003, Neurology.
19. *Late-life body mass index and dementia incidence: nine-year follow-up data from the Kungsholmen Project.* Atti AR, Palmer K, Volpato S, Winblad B, De Ronchi D, Fratiglioni L. 56:111–116, 2008, J Am Geriatr Soc.
20. *Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study.* Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, Havlik RJ. 21:49–55, 2000, Neurobiol Aging.
21. *Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study.* Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. 322:1447–1451, 2001, BMJ.
22. *Apolipoprotein E ϵ 4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease.* Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Iivonen S, Mannermaa A, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H. 137:149–155, 2002, Ann Intern Med.
23. *Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life.* Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Johnston SC, Yaffe K. 64:277–281, 2005, Neurology.
24. *Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review.* Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. 5:64–74, 2006, Lancet Neurol.
25. *The effect of borderline diabetes mellitus on the risk of dementia and Alzheimer disease.* Xu WL, Qiu CX, Winblad B, Fratiglioni L. 56:211–216, 2007, Diabetes.

26. *An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia.* Fratiglioni L., Paillard-Borg S., Winblad B. 3:343–353, 2004, Lancet Neurol.
27. *The natural history of Alzheimer's disease: a brain bank study.* Jost BC, Grossberg GT. 43: 1248–1255, 1995, J Am Geriatr Soc.
28. *Alzheimer's disease – Symptoms.* 10 Maggio 2018, nhs.uk.
29. *Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline.* Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheltens P, Tariska P, Winblad B. 14 (1): e1-26, 2007, European Journal of Neurology.
30. *Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease.* Bäckman L, Jones S, Berger AK, Laukka EJ, Small BJ. 256 (3): 195–204, 2004, Journal of Internal Medicine.
31. *Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's dementia and vascular dementia.* Deardorff WJ, Grossberg GT. 165: 5–32, 2019, Handbook of Clinical Neurology.
32. *Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology.* Petersen RC, Lopez O, Armstrong MJ, Getchius TS, Ganguli M, Gloss D, et al. 90 (3): 126–135, 2018, Neurology.
33. *Clinical features of Alzheimer's disease.* Förstl H, Kurz A. 249 (6): 288–290, 1999, European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience.
34. *Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review.* Carlesimo GA, Oscar-Berman M. 3 (2): 119–169, 1992, Neuropsychology Review.
35. *Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review.* Jelicic M, Bonebakker AE, Bonke B. 7 (3): 385–392, 1995, International Psychogeriatrics.
36. *Alzheimer's Disease Fact Sheet.* 25 January 2021, National Institute on Aging.
37. *Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future.* Bondi, Mark W., Edmonds, Emily C. e Salmon, David P. 23(9-10): 818–831, 2018, Journal of the International Neuropsychological Society.
38. *Positive Feedback Loops in Alzheimer's Disease: The Alzheimer's Feedback Hypothesis.* A.J, Doig. 2018, J Alzheimers Dis.
39. *Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease.* Reddy, P.H. 2011, Brain Res.

40. *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. 1: a006189, 2011, Cold Spring Harb Perspect Med.
41. *Alzheimer's disease*. Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. 2018, European Journal of Neurology.
42. *Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease*. Thal DR, Walter J, Saito TC, Fändrich M. 2015, Acta Neuropathol.
43. *Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils*. Verma M, Vats A, Taneja V. 2015, Annals of Indian Academy of Neurology.
44. *The amyloid precursor protein: beyond amyloid*. Zheng H, Koo EH. 1:5, 2006, Mol Neurodegener.
45. *APP processing in Alzheimer's disease*. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. doi: 10.1186/1756-6606-4-3, 2011, Mol Brain.
46. *Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides*. Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H. 96:742–747, 1999, Proc Natl Acad Sci USA.
47. *Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*. Wang X, Zhou X, Li G, Zhang Y, Wu Y, Song W. 10: 294, 2017, Front Mol Neurosci.
48. *Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease*. SS, Sisodia. 89:6075–6079, 1992, Proc Natl Acad Sci USA.
49. *Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain*. Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP. 67:1882–1896, 1996, J Neurochem.
50. *Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives*. MP, Mattson. 77:1081–1132, 1997, Physiol Rev.
51. *BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons*. Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC. 4(3):233-4, 2001, Nat Neurosci.
52. *The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1*. Cole SL, Vassar R. 2007, Mol Neurodegener.

53. *Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative.* Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. 269(18):13623-8, 1994, J Biol Chem.
54. *Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells.* Gasparini L, Racchi M, Benussi L, Curti D, Binetti G, Bianchetti A, Trabucchi M, Govoni S. 231(2):113-7, 1997, Neurosci Lett.
55. *Sodium azide and 2-deoxy-D-glucose-induced cellular stress affects phosphorylation-dependent AbetaPP processing.* Henriques AG, Domingues SC, Fardilha M, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA. 7(3):201-12, 2005, J Alzheimers Dis.
56. *Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network.* RC, Scarpulla. 1813(7):1269-78, 2011, Biochim Biophys Acta.
57. *PPAR γ co-activator-1 α (PGC-1 α) reduces amyloid- β generation through a PPAR γ -dependent mechanism.* Katsouri L, Parr C, Bogdanovic N, Willem M, Sastre M. 25(1):151-62, 2011, J Alzheimers Dis.
58. *Oligomeropathies and pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's diseases.* Forloni G, Artuso V, La Vitola P, Balducci C. 31: 771– 781, 2016, Mov Disord.
59. *Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory.* Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. 14: 837– 842, 2008, Nat Med.
60. *Soluble amyloid-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration.* Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. 108: 5819– 5824, 2011, Proc Natl Acad Sci.
61. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years.* Selkoe DJ, Hardy J. 8: 595– 608, 2016, EMBO Mol Med.
62. *Amyloid- β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls.* Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL. 73: 104– 119, 2013, Ann Neurol.
63. *Review: an update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations.* Lashley T, Rohrer JD, Mead S, Revesz T. 41: 858– 881, 2015, Neuropathol Appl Neurobiol.

64. *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies.* Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. 198–210, 2005, *Biochimica et Biophysica Acta*.
65. *R.D. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly.* Lindwall G, Cole RD. 1984, *J. Biol. Chem.*
66. *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.* Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. 1989, *Neuron*.
67. *Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK 1/2, MEK 1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease.* Pei JJ, Gong CX, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2003, *Am. J. Pathol.*
68. *Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors.* Oliver CJ, Shenolikar S. 1998, *Front. Biosci.*
69. *Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5.* F. Liu, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, C.X. Gong. 2002, *Neuroscience*.
70. *Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View.* Giovanna Cenini, Ana Lloret, Roberta Cascella. 2019, *Oxid Med Cell Longev*.
71. *Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums.* Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, Craft S, Gandy S, Buettner C, Stoeckel LE, Holtzman DM, Nathan DM. 14, 168–181, 2018, *Nat. Rev. Neurol.*
72. *Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease.* Butterfield DA, Halliwell B. 20, pages148–160, 2019, *Nature Reviews Neuroscience*.
73. *Oxidative stress, amyloid β -peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease.* Butterfield, D. A. & Boyd-Kimball, D. 62, 1345–1367, 2018, *J. Alzheimers Dis.*
74. *The triangle of death in Alzheimer's disease brain: the aberrant cross-talk among energy metabolism, mammalian target of rapamycin signaling, and protein homeostasis revealed by redox proteomics.* Di Domenico F, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA. 26, 364–387, 2017, *Antioxid. Redox Signal.*

75. *Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus.* BJ, Goldstein. 90:3G–10G, 2002, Am J Cardiol.
76. *A biochemical and functional characterization of diet-induced brain insulin resistance.* Mielke JG, et al. 93:1568–1578, 2005, J Neurochem.
77. *Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums.* Steven E. Arnold, Zoe Arvanitakis, Shannon L. Macauley-Rambach, Aaron M. Koenig, Hoau-Yan Wang, Rexford S. Ahima, Suzanne Craft, Sam Gandy, Christoph Buettner, Luke E. Stoeckel, David M. Holtzman and David M. Nathan. 14(3): 168–181, 2018, Nat Rev Neurol.
78. *Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease — is this type 3 diabetes?* Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM. 7:63–80, 2005, J Alzheimers Dis.
79. *Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline.* Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. 122:1316–133, 2012, J Clin Invest.
80. *Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial.* Craft S, Baker LD, Montine TJ, Minoshima S, Watson GS, Claxton A, Arbuckle M, Callaghan M, Tsai E, Plymate SR, Green PS, Leverenz J, Cross D, Gerton B. 69:29–38, 2012, Arch Neurol.
81. *Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose.* Chen Z, Zhong C. 108: 21-43, 2013, Prog Neurobiol.
82. *Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal.* Kandimalla R, Thirumala V, Reddy PH. 1863(5): 1078-1089, 2017, Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.
83. *Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging.* Fournet M, Bonté F, Desmoulière A. 9(5): 880–900., 2018, Aging Dis.
84. *Advanced Glycation End Products (AGEs) May Be a Striking Link Between Modern Diet and Health.* Vidhu Gill, Vijay Kumar, Kritanjali Singh, Ashok Kumar and Jong-Joo Kim. 9(12): 888, 2019 , Biomolecules.
85. *Nutrition and AGE-ing: Focusing on Alzheimer's Disease.* Abate G, Marziano M, Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. doi: 10.1155/2017/7039816, 2017, Oxid Med Cell Longev.

86. *Glycation: Implication in perceived age and dermatology*. Clatici VG, Voicu C, Kalashnicova NG, Fica S. 4:114–123, 2017, Rom. J. Clin. Experi. Dermatol.
87. *Oxidative Stress in Animal Models of Acute and Chronic Renal Failure*. Gyurászová M, Kovalčíková AG, Renczés E, Kmeťová K, Celec P, Bábíčková J, Tóthová L. doi: 10.1155/2019/8690805, 2019, Dis. Markers.
88. *Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in non diabetics)*. Uchiki T, Weikel KA, Jiao W, Shang F, Caceres A, Pawlak D, Handa JT, Brownlee M, Nagaraj R, Taylor A. 11:1–13. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00752.x, 2012, Aging Cell.
89. *Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease*. Hegab Z, Gobbons S, Neyses L, Mamas AM. 4:90–102. doi: 10.4330/wjc.v4.i4.90, 2012, orld J. Cardiol.
90. *Protein Glycation by glyoxal promotes amyloid formation by islets amyloid polypeptide*. Hsu YH, Chen YW, Wu MH, Tu LH. 116:2304–2313, 2019, Biophys. J.
91. *Inflammatory risk factors and pathologies promoting Alzheimer's disease progression: is RAGE the key?* Matrone C, Djelloul M, Tagliatela G, Perrone L. 30(2):125–139, 2015, Histology and Histopathology.
92. *Increased expression of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. Choi BR, Cho WH, Kim J, Lee HJ, Chung C, Jeon WK, Han JS. 46(2, article e75) doi: 10.1038/emm.2013.147, 2014, xperimental and Molecular Medicine.
93. *Periventricular white matter hyperintensities increase the likelihood of progression from amnestic mild cognitive impairment to dementia*. van Straaten EC, Harvey D, Scheltens P, Barkhof F, Petersen RC, Thal LJ, Jack CR Jr, DeCarli C. 255(9):1302–1308. doi: 10.1007/s00415-008-0874-y, 2008, Journal of Neurology.
94. *Upstream regulators and downstream effectors of NF- κ B in Alzheimer's disease*. Shi ZM, Han YW, Han XH, Zhang K, Chang YN, Hu ZM, Qi HX, Ting C, Zhen Z, Hong W. 366:127–134. doi: 10.1016/j.jns.2016.05.022, 2016, Journal of the Neurological Sciences.
95. *The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach*. Salahuddin P, Rabbani G, Khan RH. 19(3):407–437. doi: 10.2478/s11658-014-0205-5, 2014, Cellular and Molecular Biology Letters.
96. *Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism*. Lue LF, Walker DG, Brachova L, Beach TG, Rogers J, Schmidt AM, Stern DM, Yan SD. 171(1):29–45. doi: 10.1006/exnr.2001.7732, 2001, Experimental Neurology.

97. *Involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in Alzheimer's disease.* Takeuchi M, Kikuchi S, Sasaki N, Suzuki T, Watai T, Iwaki M, Bucala R, Yamagishi S. 1(1): 39-46, 2004, Curr Alzheimer Res.
98. *"Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease.* Sato, T., N. Shimogaito, et al. 21(3): 197-208, 2006, Am J Alzheimers Dis Other Demen.
99. *Glyceraldehyde-derived advanced glycation end products in Alzheimer's disease.* Choei H, Sasaki N, Takeuchi M, Yoshida T, Ukai W, Yamagishi S, Kikuchi S, Saito T. 108(3): 189-93, 2004, Acta Neuropathol.
100. *Glyceraldehyde caused Alzheimer's disease-like alterations in diagnostic marker levels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.* Koriyama Y, Furukawa A, Muramatsu M, Takino J, Takeuchi M. 5: 13313. doi: 10.1038/srep13313, 2015, Sci Rep.
101. *Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease.* Butterfield DA, Halliwell B. 2019, Nature reviews. Neuroscience.
102. *Interactions of Mitochondria/Metabolism and Calcium Regulation in Alzheimer's Disease - A Calcinist Point of View.* Gibson GE, Thakkar A. doi: 10.1007/s11064-017-2182-3, 2018, Neurochem Res.
103. *Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging.* Khachaturian, Z. S. 747, 1–11, 1994, Ann. N. Y. Acad. Sci.
104. *Ca²⁺ homeostasis dysregulation in Alzheimer's disease: a focus on plasma membrane and cell organelles.* Wang X, Zheng W. Volume 33, Issue 6 p. 6697-6712, 2019, The FASEB Journal.
105. *Functional interplay between plasma membrane Ca²⁺-ATPase, amyloid β -peptide and tau.* AM, Mata. 663, 55– 59, 2018, Neurosci. Lett.
106. *Lysosomal Ca(2+) homeostasis: role in pathogenesis of lysosomal storage diseases.* Lloyd-Evans E, Platt FM. 50, 200– 205, 2011, Cell Calcium.
107. *Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels.* Foskett JK, White C, Cheung K-H, Mak D-OD. 87:593–658, 2007, Physiological Reviews.
108. *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease.* Periasamy M, Kalyanasundaram A. 35(4):430-42. doi: 10.1002/mus.20745., 2007, Muscle Nerve.
109. *Modulation of vascular sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in cardiovascular pathophysiology.* T, Adachi. 59:165-95., 2010, Adv Pharmacol.

110. *Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease*. Magi S, Castaldo P, Macrì ML, Maiolino M, Matteucci A, Bastioli G, Gratteri S, Amoroso S, Lariccia V. 2016:6701324. doi: 10.1155/2016/6701324., 2016, Biomed Res Int.
111. *Store-Operated Calcium Channels*. Prakriya, Murali. 2013, Current Topics in Membranes.
112. *Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: A dynamic equilibrium*. Sammels E, Parys JB, Missiaen L, De Smedt H, Bultynck G. 47:297–314., 2010, Cell Calcium.
113. *Basic and editing mechanisms underlying ion transport and regulation in NCX variants*. Khananshvil, D. 102131, 2020, Cell Calcium.
114. *Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3)*. Linck B, Qiu Z, He Z, Tong Q, Hilgemann DW, Philipson KD. 274:C415–C423, 1998, Am J Physiol.
115. *Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions*. D, Khananshvil. 466, pages43–60, 2014, Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.
116. *Tissue-specific expression of Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoforms*. Lee SL, Yu AS, Lytton J. 269:14849–14852, 1994, J Biol Chem .
117. *Glutamate as a potential "survival factor" in an in vitro model of neuronal hypoxia/reoxygenation injury: leading role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger*. Piccirillo S, Castaldo P, Macrì ML, Amoroso S, Magi S. 2018, Cell Death Dis.
118. *NCX1 and EAAC1 transporters are involved in the protective action of glutamate in an in vitro Alzheimer's disease-like model*. Magi Simona, Piccirillo Silvia, Maiolino Marta, Lariccia Vincenzo, Amoroso, Salvatore. 2020, Cell Calcium.
119. *Gateways for Glutamate Neuroprotection in Parkinson's Disease (PD): Essential Role of EAAT3 and NCX1 Revealed in an In Vitro Model of PD*. Piccirillo S, Magi S, Preziuso A, Castaldo P, Amoroso S, Lariccia V. 2020, cells.
120. *NCX1 and EAAC1 transporters are involved in the protective action of glutamate in an in vitro Alzheimer's disease-like model*. Magi S, Piccirillo S, Maiolino M, Lariccia V, Amoroso S. 2020, Cell Calcium.
121. *Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies*. Tong BC, Wu AJ, Li M, Cheung KH. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.018, 2018, Molecular Cell Research.

122. *Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice.* Chakroborty S, Goussakov I, Miller MB, Stutzmann GE. 29 pp. 9458-9470, 2009, J. Neurosci.
123. *Altered ryanodine receptor expression in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.* A.M. Bruno, J.Y. Huang, D.A. Bennett, R.A. Marr, M.L. Hastings, G.E. Stutzmann. 33pp. 1001.e1-1001.e6, 2012, Neurobiol. Aging.
124. *SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid β production.* Green KN, Demuro A, Akbari Y, Hitt BD, Smith IF, Parker I, LaFerla FM. 181 pp. 1107-1116, 2008, J. Cell Biol.
125. *Linking calcium to A β and Alzheimer's disease.* Green KN, LaFerla FM. 59 pp. 190-194, 2008, Neuron.
126. *Calcium dysregulation in Alzheimer's disease.* Bojarski L, Herms J, Kuznicki J. 52 pp. 621-633, 2008, Neurochem. Int.
127. *Ca²⁺ influx through store-operated Ca²⁺ channels reduces Alzheimer disease β -amyloid peptide secretion.* W. Zeiger, K.S. Vetrivel, V. Buggia-Prévot, P.D. Nguyen, S.L. Wagner, M.L. Villereal, G. Thinakaran. 288 pp. 26955-26966, 2013, J. Biol. Chem.
128. *Familial Alzheimer's disease-associated presenilin 1 mutants promote γ -secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca²⁺ entry.* Tong BC, Lee CS, Cheng WH, Lai KO, Foskett JK, Cheung KH. 9, Article ra89, 2016, Sci. Signal.
129. *Calcium, reactive oxygen species, and synaptic plasticity.* Hidalgo C, Arias-Cavieres A. 31 (2016), pp. 201-215, Physiology.
130. *Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition.* Hansson MJ, Månsson R, Morota S, Uchino H, Kallur T, Sumi T, Ishii N, Shimazu M, Keep MF, Jegorov A, Elmér E. 45 (2008), pp. 284-294, Free Radic. Biol. Med.
131. *Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta.* Du H, Yan SS. 1802 (2010), pp. 198-204, Biochim. Biophys. Acta.
132. *C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein inhibits sodium/calcium exchanger activity in SK-N-SH cell.* Kim HS, Lee JH, Suh YH. 10, 113– 116, 1999, Neuroreport.
133. *Calpain cleavage and inactivation of the sodium calcium exchanger-3 occur downstream of A β in Alzheimer's disease.* Atherton J, Kurbatskaya K, Bondulich M, Croft CL, Garwood CJ, Chhabra R, Wray S, Jeromin A, Hanger DP, Noble W. 13, 49– 59, 2014, Aging Cell.

134. *Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity.* Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefeuvre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P. 2005, cell.
135. *p35/Cdk5 pathway mediates soluble amyloid-beta peptide-induced tau phosphorylation in vitro.* Town T, Zolton J, Shaffner R, Schnell B, Crescentini R, Wu Y, Zeng J, DelleDonne A, Obregon D, Tan J, Mullan M. 2002, J Neurosci Res.
136. *Vaisid T, Kosower NS, Katzav A, Chapman J, Barnoy S. Noble W, Garwood C, Stephenson J, Kinsey AM, Hanger DP, Anderton BH. 2007, Neurochem Int. .*
137. *Calpain cleavage and inactivation of the sodium calcium exchanger-3 occur downstream of A β in Alzheimer's disease.* Atherton J, Kurbatskaya K, Bondulich M, Croft CL, Garwood CJ, Chhabra R, Wray S, Jeromin A, Hanger DP, Noble W. 2014, Aging Cell.
138. *Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease.* Misrani A, Tabassum S, Yang L. 2021, Frontiers in aging neuroscience.
139. *Mitochondria, oxidants, and aging.* Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. 2005, Cell.
140. *Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Bezprozvanny I, Mattson MP. 2008, Trends Neurosci.
141. *Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease.* Green KN, LaFerla FM. 2008, Neuron.
142. *Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models.* Green KN, Smith IF, Laferla FM. 2007, Subcell Biochem.
143. *Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Abeta generation.* Y Tong, W Zhou, V Fung, M A Christensen, H Qing, X Sun, W Song. 2005, J Neural Transm.
144. *Impaired mitochondrial calcium efflux contributes to disease progression in models of Alzheimer's disease.* Jadiya P, Kolmetzky DW, Tomar D, Di Meco A, Lombardi AA, Lambert JP, Luongo TS, Ludtmann MH, Praticò D, Elrod JW. 2019, Nat Commun.
145. *Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Bezprozvanny I, Mattson MP. 2008, Trends Neurosci.
146. *Oxidative stress in alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics.* Cassidy L, Fernandez F, Johnson JB, Naiker M, Owoola AG, Broszczak DA. 2020 , Complement Ther Med.
147. *Advanced glycation end products enhance amyloid precursor protein expression by inducing reactive oxygen species.* Ko SY, Lin YP, Lin YS, Chang SS. 2010, Free Radic Biol Med.

148. *Alterations of the Endoplasmic Reticulum (ER) Calcium Signaling Molecular Components in Alzheimer's Disease*. Chami M, Checler F. 2020 , Cells.
149. *Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain*. Kurbatskaya K, Phillips EC, Croft CL, Dentoni G, Hughes MM, Wade MA, Al-Sarraj S, Troakes C, O'Neill MJ, Perez-Nievas BG, Hanger DP, Noble W. 2016 , Acta Neuropathol Commun.
150. *Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death*. Calvo-Rodriguez M, Bacskai BJ. 2021 , Trends Neurosci.
151. *Calcium and neurodegeneration*. Mattson, MP. 2007, Aging Cell.
152. *Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease*. Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, Smith MA, Zhu X. 2008 , Curr Alzheimer Res.
153. *Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease*. Tönnies E, Trushina E. 2017, J Alzheimers Dis.
154. *A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease*. Francesco Panza, Madia Lozupone, Giancarlo Logroscino, Bruno P Imbimbo. 2019, Nat Rev Neurol.
155. *The Neuroprotective Effect of L-Carnitine against Glyceraldehyde-Induced Metabolic Impairment: Possible Implications in Alzheimer's Disease*. Magi S, Preziuso A, Piccirillo S, Giampieri F, Cianciosi D, Orciani M, Amoroso S. 2021, Cells, p. DOI: 10.3390/cells10082109.
156. *Selective inhibition of mitochondrial sodium-calcium exchanger protects striatal neurons from α -synuclein plus rotenone induced toxicity*. Bastioli G, Piccirillo S, Castaldo P, Magi S, Tozzi A, Amoroso S, Calabresi P. 2019, Cell Death Dis.
157. *Neuronal NOS activation during oxygen and glucose deprivation triggers cerebellar granule cell death in the later reoxygenation phase*. Scorziello A, Pellegrini C, Secondo A, Sirabella R, Formisano L, Sibaud L, Amoroso S, Canzoniero LM, Annunziato L, Di Renzo GF. 2004 , J Neurosci Res.
158. *Cell sensitivity assays: the MTT assay*. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. 2011, Methods Mol Biol.
159. *Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances*. Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X. 2020, Molecular neurodegeneration.
160. *Glyceraldehyde caused Alzheimer's disease-like alterations in diagnostic marker levels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. Koriyama Y, Furukawa A, Muramatsu M, Takino J, Takeuchi M. 2015 , Sci Rep.

161. *Positive Feedback Loops in Alzheimer's Disease: The Alzheimer's Feedback Hypothesis.* AJ, Doig. 2018, J Alzheimers Dis.
162. *The Neuroprotective Effect of L-Carnitine against Glyceraldehyde-Induced Metabolic Impairment: Possible Implications in Alzheimer's Disease.* Magi S, Preziuso A, Piccirillo S, Giampieri F, Cianciosi D, Orciani M, Amoroso S. 2021 , Cells.
163. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine.* s.l. : Oxford Univ. Press, 2015.
164. *Acceleration of amyloid beta-peptide aggregation by physiological concentrations of calcium.* Isaacs AM, Senn DB, Yuan M, Shine JP, Yankner BA. 2006, J Biol Chem.
165. *Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine.* De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL. 2007 , J Biol Chem.
166. *Abeta(25-35) and Abeta(1-40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons.* Rovira C, Arbez N, Mariani J. 2002, Biochem Biophys Res Commun.
167. *Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers.* Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. 2005 , J Biol Chem.
168. *Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes.* Arispe N, Pollard HB, Rojas E. 1993, Proc Natl Acad Sci U S A.
169. *NF-kappaB activated by ER calcium release inhibits Abeta-mediated expression of CHOP protein: enhancement by AD-linked mutant presenilin 1.* Schapansky J, Olson K, Van Der Ploeg R, Glazner G. 2007, Exp Neurol.
170. *Amyloid-beta protein impairs Ca²⁺ release and contractility in skeletal muscle.* Shtifman A, Ward CW, Laver DR, Bannister ML, Lopez JR, Kitazawa M, LaFerla FM, Ikemoto N, Querfurth HW. 2010 , Neurobiol Aging.
171. *Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities.* Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA. 2002, Journal of Neurochemistry.
172. *Beta-Amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase.* Abramov AY, Canevari L, Duchon MR. 2004, J Neurosci.

173. *Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression.* Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. 2006, Hum Mol Genet.
174. *Characteristic attributes limiting the transport rates in NCX orthologs.* Refaeli B, Hiller R, Khananshvil D. 2022, Biochim Biophys Acta Biomembr.
175. —. Refaeli B, Hiller R, Khananshvil D. 2022, Biochim Biophys Acta Biomembr.
176. *Essential role of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) in glutamate-enhanced cell survival in cardiac cells exposed to hypoxia/reoxygenation.* Maiolino M, Castaldo P, Lariccia V, Piccirillo S, Amoroso S, Magi S. 2017, Scientific reports.
177. *Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1 inhibition abolishes ischemic tolerance induced by ischemic preconditioning in different cardiac models.* Castaldo P, Macrì ML, Lariccia V, Matteucci A, Maiolino M, Gratteri S, Amoroso S, Magi S. 2017, Eur J Pharmacol.
178. *Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative.* Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. 1994, J Biol Chem.
179. *Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells.* Gasparini L, Racchi M, Benussi L, Curti D, Binetti G, Bianchetti A, Trabucchi M, Govoni S. 1997, Neurosci Lett.
180. *The effects of perturbed energy metabolism on the processing of amyloid precursor protein in PC12 cells.* Webster MT, Pearce BR, Bowen DM, Francis PT. 1998, J Neural Transm.
181. *Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies.* Chen Z, Zhong C. 2013, Progress in Neurobiology.
182. *Involvement of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in intracellular Ca²⁺ increase and neuronal injury induced by polychlorinated biphenyls in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.* Magi S, Castaldo P, Carrieri G, Scorziello A, Di Renzo G, Amoroso S. 2005, J Pharmacol Exp Ther.
183. [Online] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
184. *Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons.* Kemmerling U, Muñoz P, Müller M, Sánchez G, Aylwin ML, Klann E, Carrasco MA, Hidalgo C. 41:491–502, 2007, Cell Calcium.
185. *Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease.* O'Brien RJ, Wong PC. 2011, Annu Rev Neurosci.

186. *Selective inhibition of mitochondrial sodium-calcium exchanger protects striatal neurons from α -synuclein plus rotenone induced toxicity.* Bastioli G, Piccirillo S, Castaldo P, Magi S, Tozzi A, Amoroso S, Calabresi P. 2019, Cell Death Dis.
187. *Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure.* Sokolov Y, Kozak JA, Kaye R, Chanturiya A, Glabe C, Hall JE. 2006, J Gen Physiol.
188. *Ca²⁺-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in neuronal tissues.* Pirollet F, Margolis RL, Job D. 1992, Biochim. Biophys. Acta.
189. *Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease.* Del Prete D, Checler F, Chami M. 9, 21, 2014, Mol. Neurodegener.
190. *Selective inhibition of mitochondrial sodium-calcium exchanger protects striatal neurons from α -synuclein plus rotenone induced toxicity.* Bastioli G, Piccirillo S, Castaldo P, Magi S, Tozzi A, Amoroso S, Calabresi P. 2019, Cell Death Dis.
191. *Store-operated calcium entry: mechanisms and modulation.* Hogan PG, Rao A. 460(1): 40–49.doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.110, 2016, Biochem Biophys Res Commun.
192. *The pathogenesis of Alzheimer's disease—is it a lifelong “calciumopathy”?* Stutzmann, GE. 13 pp. 546-559, 2007, Neuroscientist.
193. *Calcium Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease Pathogenesis.* Cascella R, Cecchi C. 2021, Int J Mol Sci.