



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	102010901847623
Data Deposito	11/06/2010
Data Pubblicazione	11/12/2011

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

Titolo

METODO PER LA DIAGNOSTICA E IL TRATTAMENTO DELLE TAUPATIE

Metodo per la diagnosi e il trattamento di tauopatie

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a un metodo per la diagnosi di tauopatie, in particolare il morbo di Alzheimer. Il metodo si basa sul rilevamento e sulla quantificazione di un frammento di tau NH2 di 20-22 kDa. La presente invenzione si riferisce anche al trattamento di tauopatie mediante antagonisti specifici.

TECNICA ANTERIORE

Le sinapsi sono siti ultrastrutturali per la conservazione della memoria nel cervello e il danno sinaptico è la miglior concausa patologica nel declino cognitivo nel morbo di Alzheimer (AD). Iperfosforilazione post-traslazionale, troncamento mediato da enzimi, modifiche nella conformazione e aggregazione della proteina tau in grovigli neurofibrillari ("neurofibrillary tangles", NFT) sono segni distintivi per un gruppo eterogeneo di disturbi neurodegenerativi, le cosiddette tauopatie. AD è una tauopatia secondaria, in quanto è patologicamente contraddistinta dalla presenza di placche senili contenenti β -amiloide e dalla presenza di NFT tau-positivi nella neocorteccia e nell'ippocampo.

Il morbo di Alzheimer è una demenza neurodegenerativa progressiva caratterizzata da deficit di memoria e perdita neuronale estesa. Sebbene la presenza di placche extracellulari di β -amiloide e grovigli neurofibrillari di tau intracellulari sia tipicamente considerata un classico segno distintivo neuropatologico di tale disturbo, la perdita di sinapsi in determinate aree del cervello destinate alla memoria e ai processi di apprendimento è maggiormente correlata al declino cognitivo rispetto a placche e a grovigli [1-6]. Effettivamente, il decadimento sinaptico è il segno più precoce di un disturbo cognitivo che si presenta prima o anche in assenza di perdita neuronale sia in pazienti che in modelli di topi transgenici di AD [5-14]. Studi post mortem che utilizzano microscopia elettronica quantitative (EM) e analisi biochimiche in pazienti con AD allo stato da iniziale a medio hanno riportato perdita di terminali assonici [15,16], espressione alterata di proteine pre- e post-sinaptiche [17-22] e scomparsa di spine dendritiche, che sono note per essere il sito post-sinaptico principale per la trasmissione sinaptica eccitatoria [23-26].

Diversi studi su modelli cellulari e animali indicano che la proteina tau è un mediatore necessario di neurotossicità $A\beta$ -indotta [27-29]. L'accumulo intraneuronale $A\beta$ precede e

favorisce la patologia neurofibrillare della tau in topi transgenici e in cervelli con AD [30-34], probabilmente anche attraverso la generazione di frammenti di tau troncati [35-38] che possono acquisire proprietà tossiche, a prescindere dal loro stato di aggregazione [39]. Il livello aumentato di forme di tau con NH₂-troncato sono rilevate precocemente nel fluido cerebrospinale di pazienti con AD [40,41] e il clivaggio proteolitico della tau genera frammenti amiloidogenici, che tendono maggiormente all'aggregazione [36,37,42]. D'altra parte, la deposizione di A β e l'iperfosforilazione della tau si sviluppano entrambi in prossimità l'una dell'altra in terminali sinaptici dell'ippocampo e della corteccia entorinale di soggetti con AD e topi transgenici affetti dalla patologia, mettendo così in risalto il fatto che amiloide e patologie della tau sono *in vivo* spazialmente associate in sinapsi neuronali [43,44].

Un'analisi immunistochemica eseguita con un anticorpo della proteina tau NH₂ caspasi-clivata (denominato anticorpo CCP-NH₂ tau) [35]-riconoscendo la sequenza della proteina tau umana collocata sull'estremità ammino-terminale DRKD₂₅-QGGYTMHQDQ (SEQ ID No. 2), nota per essere una dei siti di consenso per il clivaggio mediante caspasi [45]-mostra una marcatura selettiva e diffusa di NFT, filamenti del neuropilo e neuriti distrofiche in sezioni di cervello con AD, ma non in controlli age-matched. Attraverso Western blotting e studi immunistochemici gli autori hanno anche dimostrato che un frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa che è disposto probabilmente tra gli amminoacidi 26 e 230 della lunghezza massima del'isoforma della tau di lunghezza completa (NCBI ID *proteina* AAC04279.1), pertanto con la seguente sequenza:

QGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPGSETSDAKSTP
 TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR
 IPAKTPPAPK TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT
 REPKKVAVVR (SEQ ID No. 1) è rilevato in modelli cellulari e animali con AD [46].

Inoltre un peptide NH₂-26-44 sintetizzato, che è la "moity" attiva minima che conserva l'effetto deleterio *in vitro* del più lungo frammento di tau umana sovraespresso NH₂-26-230 [47,48], compromette la fosforilazione ossidativa mitocondriale e riduce la biodisponibilità di ATP intracellulare, probabilmente agendo sullo scambio di ADP/ATP mediato dal traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT) [49]. Nel presente studio, gli autori esaminano (i) se il livello di tale frammento di tau NH₂ è arricchito in sinaptosomi e mitocondri sinaptici in pazienti umani con AD, paragonato a campioni di controllo non

affetti da demenza, age- matched e (ii) se è correlato a variazioni sinaptiche, in relazione all'entità della degenerazione neurofibrillare e neuropatologia amiloidea.

RIEPILOGO DELL'INVENZIONE

5 Nella presente invenzione gli autori riportano che un frammento di tau con troncato NH₂ di 20-22 kDa è ampiamente arricchito in mitocondri umani da sinaptosomi crioconservati di cervelli con AD e che la quantità in campi terminali è correlata alle variazioni sinaptiche patologiche e alla compromissione funzionale dell'organello. Questa forma di tau con NH₂ troncato è anche presente in altre tauopatie umane, non AD, mentre la sua presenza in
10 pazienti con AD è legata a specie multimeriche di A β e alla gravità della patologia. Infine estratti arricchiti di oligomeri di Abeta (A β) nativi, derivati da pazienti, verosimilmente compromettono la funzione mitocondriale nella produzione *in vitro* del frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa in SY5Y umano maturo e in neuroni ippocampali di ratto.

Pertanto quanto scoperto dagli autori indica che la distribuzione del peptide di tau NH₂-
15 derivato mitocondriale può aggravare la degenerazione sinaptica che si presenta in tauopatie, compreso AD, e favorisce gli inibitori del clivaggio della tau NH-2 *in vivo* come una strategia alternativa nella ricerca di farmaci per la terapia di AD.

Pertanto è oggetto della presente invenzione un metodo per la diagnosi e/o la prognosi di una tauopatia in un campione biologico ottenuto da un soggetto, comprendente:

20 - quantificazione della quantità di un frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa comprendente la sequenza QGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPGSETSDAKSTP
TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR
IPAKTPPAPK TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPT
25 REPKKVAVVR (SEQ ID No. 1) oppure un suo frammento di 20-22 kDa in detto campione;

- confronto della quantità quantificata del frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa comprendente SEQ ID No. 1 nel campione con una quantità di controllo adatta.

In particolare, la quantità di controllo adatta può essere la quantità quantificata in un
30 soggetto normale sano oppure in un soggetto non affetto da tauopatia. Una tauopatia è presente se nel soggetto di test si ha una quantità aumentata del frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa comprendente SEQ ID No. 1 oppure un suo frammento di 20-22 kDa.

In alternativa il metodo comprende:

- rilevamento della presenza di un complesso di traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT1)/frammento di tau 20-22kDa NH₂ in detto campione in cui il frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa comprende la sequenza di SEQ ID No. 1 oppure un suo frammento di 20-22 kDa;

5 e in cui la presenza di detto complesso è indicativa di una tauopatia.

Preferibilmente, la tauopatia è selezionata dal gruppo di: morbo di Alzheimer (AD), demenza a corpi di Lewy (DLB), morbo di Pick (PiD), degenerazione cortico-basale (CBD), o paralisi sopranucleare progressiva (PSP).

10 Ancora preferibilmente, il campione biologico è selezionato dal gruppo di biopsia cerebrale o CSF.

Preferibilmente, la biopsia cerebrale deriva dall'ippocampo o dalla corteccia cerebrale.

15 Nella presente invenzione il frammento di 20-22 kDa della SEQ ID No. 1 può essere un frammento più piccolo con da 1 a 20 amminoacidi in meno. Il frammento può essere un frammento funzionale di SEQ ID No. 1, cioè un frammento che mantiene la caratteristica di tossicità di SEQ ID No. 1.

I metodi dell'invenzione possono essere utilizzati anche per seguire il corso di una tauopatia o per seguire l'effetto di un trattamento terapeutico sulla tauopatia. In questo caso, la quantità di controllo adatta è quantificata da un soggetto prima del trattamento farmacologico oppure in momenti diversi.

20 Un altro oggetto della presente invenzione è un antagonista funzionale di un frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa comprendente la sequenza di SEQ ID No. 1 oppure un suo frammento di 20-22 kDa oppure un complesso di traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT1)/frammento di tau-NH₂ di 20-22kDa per l'utilizzo come agente per il trattamento di una tauopatia.

25 Preferibilmente, l'antagonista funzionale è selezionato dal gruppo composto da: un anticorpo, un frammento Fab, un derivato sintetico, una molecola antisense.

Preferibilmente, la tauopatia è selezionata dal gruppo di: morbo di Alzheimer (AD), demenza a corpi di Lewy (DLB), morbo di Pick (PiD), degenerazione cortico-basale (CBD), o paralisi sopranucleare progressiva (PSP).

30 Nella presente invenzione l'antagonista funzionale può prevenire l'effetto patologico o fisiologico del frammento di tau-NH₂ di 20-22 KDa comprendente la sequenza di SEQ ID No. 1 oppure un suo frammento di 20-22 kDa oppure un complesso di traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT1)/frammento di tau-NH₂ di 20-22kDa. Può anche essere

un inibitore dell'interazione tra il traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT1) e il frammento di tau-NH₂ di 20-22kDa.

La presente invenzione viene ora illustrata per mezzo delle seguenti figure non limitative.

Figura 1. Il frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa è localizzato a livello maggiore in sinapsi con AD rispetto al controllo senza demenza, in correlazione alla forma attiva della caspasi-3. A-B-C-D): Valutazione qualitative della preparazione sinaptosomiale umana. Analisi Western blotting di quantità uguali di proteina (20 µg) preparate da frazioni totali e sinaptosomiali (sin) con anticorpi specifici per proteine pre-sinaptiche (A) e post-sinaptiche (B) e per la proteina non-sinaptica GAPDH (C) ha dimostrato l'efficienza dell'arricchimento sinaptico. α-actinina-2 è stata utilizzata come controllo di carico (D). E-F-G) Western blotting rappresentativa (n=3) che mette a confronto quantità uguali di lisati proteici totali (E) e sinaptosomiali (F) (50 µg) di un controllo senza demenza (ND) e soggetti con AD esaminati con anticorpo NH₂ 4268 tau (aa26-36). Conformemente alla precedente documentazione degli autori, quantità uguali di estratti proteici totali (50 µg) da SY5Y neuronale trattato con STS per 6 ore, che esprimeva intensamente le isoforme di tau più corte [172], erano anche caricate per file e incluse come controllo interno della mobilità elettroforetica e del carico proteico. È degno di nota il fatto che l'intensità di segnale dell'immunoreattività della tau di estratti totali di SY5Y è paragonabile in due filtri, per consentire il confronto diretto tra la massa proteica totale applicata a file diverse. In aggiunta, poiché sono stati impiegati condizioni identiche e tempi di esposizione per l'acquisizione di immagini per campioni sperimentali diversi, il segnale della tau degli estratti di cervello totali diveniva saturo confronto a quello della frazione proteica sinaptica. Si noti anche la presenza di aggregati di tau a elevato peso molecolare, che migrano lentamente ed erano rilevabili soltanto in condizioni patologiche. L'analisi densitometrica della banda di immunoreattività del frammento di tau-NH₂ di 20-22 KDa in tutti i casi presentanti la malattia (n=15) era espressa come percentuale del campione di controllo (caso senza demenza) (n=10), in cui il controllo ha un valore pari a 1(G). Ciascun dato è la media ± SE (barre) di esperimenti indipendenti (n=19) e differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante test t di Student appaiato (**p<0.01). H): La distribuzione sinaptica di caspasi-3 clivata è stata anche controllata. Western blotting rappresentativo (n=2) che confronta una quantità uguale di lisati proteici sinaptosomiali (25-30 µg) di soggetti di controllo senza demenza (ND) e soggetti con AD

esaminati con anticorpo NH₂ 4268 tau (aa26-36) e con anticorpo contro la forma clivata dell'enzima caspasi-3. I livelli proteici erano normalizzati ad α -actinina-2 come controllo di carico. I): lisati di preparazioni sinaptosomiali (20 μ g) di casi di controllo senza demenza (ND) e casi AD, sono stati analizzati (n=3) per 6E10 A β (aa4-9). α -actinina-2 è stata utilizzata come controllo di carico.

Figura S1. Caratterizzazione dell'affinità e della specificità dell'anticorpo policlonale NH₂ 4268 tau.

A-B-C-D-E): antisiero di NH₂ 4268 tau (SG-4268) è stato generato in laboratori Sigma-Genosys (UK) contro un peptide sintetico purificato con HPLC, che corrisponde a residui 26-36 della isoforma più lunga della proteina tau umana (progetto 18966-1). Il peptide di NH₂ 26-36 tau sintetico, KLH-coniugato è stato utilizzato per l'immunizzazione di conigli bianchi della Nuova Zelanda e test ematici sono stati poi valutati per la mappatura di epitopi mediante saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato (ELISA). L'anticorpo NH₂ 4268 tau purificato per affinità (0,5mg/ml) ha reagito con un peptide sintetico che corrisponde a residui 26-36 in tau umana, ma non con un pannello di altri peptidi che corrispondono entro l'ammino-terminale a metà della proteina, compreso il peptide 1-25. La specificità dell'anticorpo policlonale purificato è stata poi analizzata confrontandolo con il suo siero pre-immune, mediante SDS-PAGE di estratti proteici umani (A). Un frammento di tau NH₂ del peso molecolare 20-22kDa è stato rilevato attraverso siero immune (A sinistra) in estratti proteici totali di SH-SY5Y differenziato indotto ad apoptosi dopo trattamento STS di 6h, conformemente con quanto esposto nella relazione precedente degli autori [46]. Infine, Western blotting di sinaptosomi AD paragonati all'immunoreattività relativa degli anticorpi NH₂ 4268 tau e CCP- NH₂ tau. Campioni proteici di sinaptosomi AD sono stati applicati sul gel in due file diverse e dopo il trasferimento la membrana è stata tagliata in due parti uguali e analizzata in parallelo con anticorpi NH₂ 4268 tau e CCP- NH₂ tau (B). Si noti il fatto che il frammento di tau NH₂ del peso molecolare 20-22 kDa è stato rilevato soltanto in sinaptosomi AD, mentre non è rilevabile in quantità di proteine uguali di estratti totali con AD oppure sinaptosomi AD. β -actina è stata utilizzata come carico di controllo.

L'identità del frammento di tau NH₂ troncato di 20-22 kDa esaminato con NH₂ 4268 tau è stata infine confermata da analisi Western blotting di quantità uguali di frazioni sinaptosomiali umane con diversi anticorpi tau in commercio e non in commercio, fosforilazione-indipendente, cioè Tau12-27 (aa NH₂ 12-27), DC39N1 (aa NH₂ 45-73), HT7 (aa NH₂ 159-163), che sono rivolti rispettivamente contro l'estremità prossimale/centrale

NH₂ della proteina tau umana di lunghezza completa. Sebbene con intensità differente, la mappatura di epitopi per affinità immunologica ha identificato il frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa come positivo per DC39N1 (C) e HT7 (D), mentre soltanto la banda superiore della doppietta era positiva per Tau 12-27(E), verosimilmente a causa di una parziale

5 distruzione dell'epitopo che potrebbe rimuovere interazioni cruciali tra anticorpo e antigene e reduce l'affinità dell'anticorpo. Inoltre, conformemente ai precedenti dati degli autori in modelli con AD animali e cellulari [46], Tau13 (aa NH₂ 1-13) - un anticorpo che reagisce con l'estremità NH₂ della proteina tau di lunghezza completa- non veniva visualizzato il frammento di tau NH₂ troncato di 20-22 kDa, che era invece rilevabile in

10 un'esposizione prolungata con Tau21 (aa NH₂ 21-36) (non mostrata), facendo così pensare che una rimozione della parte adiacente non coinvolta nel legame anticorpale potrebbe disgregare la conformazione della regione molecolare adiacente necessaria alla presentazione dell'epitopo *in vivo*.

Figura 2. L'accumulo del frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa è associato ad

15 **alterazioni sinaptiche in soggetti con AD.** A-T): Analisi immunoblotting di quantità uguali di proteina (20 µg) di preparazioni sinaptosomiali di casi di controllo senza demenza (ND) e due casi con AD rappresentativi (AD) per NH₂ 4268 tau (aa26-36) (A), α-sinucleina (B), SNAP-25 (C), sinapsina I (D), sinaptofisina (E), PSD95 (F), Ser9 (P+) cofilina (G), Fyn chinasi (H), AT180-Thr231 (P+)tau (I), PHF13-Ser396(P+) tau(L), AT100-Thr212/Ser214(P+)tau (M), AT8-Ser202/Thr205 (P+)tau(N), caspasi-3

20 clivata (O), Ser129(P+)α-sinucleina (P), 6E10 (Q), PS1(R) N-terminale. Nè α-actinina nè β-actina (non mostrata), che sono state utilizzate come controllo di carico, non hanno subito cambiamenti simili. Analisi densitometrica di bande di immunoreattività (%/β-actina) rilevate mediante diversi anticorpi è stata espressa come rapporto del campione di

25 controllo (caso senza demenza), in cui il controllo ha un valore pari a 1.

Figura 3. Il profilo di solubilità del frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa in cervelli con AD. Viene mostrato il profilo di solubilità del/dei frammento/i di tau NH₂-derivato/i di 20-22 kDa di una frazione sinaptosomiale di un controllo senza demenza, age-matched (ND) e un soggetto rappresentativo con AD (AD). Il profilo è stato generato utilizzando tamponi

30 sequenziali di stringenza crescente: sale a elevato peso molecolare, tampone RIPA, SDS al 2%. Una quantità uguale di materiale di ciascuna fase di estrazione (75 µg) è stata caricata a file e l'anticorpo NH₂ 4268 tau (1:600) è stato utilizzato per l'analisi immunoblotting. Si noti il fatto che per rivelare la reazione con il frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa, quantità

di proteina totale sono state caricate per file e la concentrazione di anticorpo utilizzata è stata aumentata. L'analisi densitometrica della banda di intensità, per il frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa più basso, è stata mostrata di lato e la quantificazione è stata eseguita normalizzando il campione verso la quantità corrispondente di β -actina, in base a

5 [70]. Gli istogrammi mostrano il rapporto del frammento di tau troncato NH₂/ β -actina (in alto) e frammento di tau troncato NH₂/tau di lunghezza totale (in basso) e i valori sono stati espressi come percentuale rispetto al rispettivo controllo. Ciascun dato è la media \pm SE (barre) di tre esperimenti indipendenti e differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante test t di Student appaiato (*p<0.05; ***p<0.001).

10 **Figure 4. La ridistribuzione patologica del frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa in mitocondri sinaptici è accompagnata da compromissione dell'organello.** A-B-C-D-E-F-G): la distribuzione del frammento di tau di 20-22 kDa NH₂-derivato è stata paragonata in quantità proteiche uguali di frazioni citosoliche e mitocondriali (25 μ g) di un soggetto di controllo senza demenza (ND) e un soggetto rappresentativo con AD (AD),

15 mediante Western blotting con anticorpo NH₂ 4268 tau (aa26-36)(A). Per assicurare l'arricchimento del frazionamento subcellulare, l'immunoblotting è stata eseguita con anticorpi specifici per cyt C (D) e MnSOD-II (E) mitocondriali, due proteine localizzate nello spazio intra-membrana, per ANT (B) and COXIV(C), altre due proteine localizzate invece nella membrane interna dell'organello, e per SOD-I citosolico (F). L'accumulo di

20 A β peptide(i) in mitocondri AD è stato anche esaminato con anticorpo 6E10 (G). H-I-L-M): è stata riportata l'analisi biochimica della localizzazione mitocondriale sinaptica del frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa. Quantità di proteine citosoliche e mitocondriali (25 μ g) di un soggetto di controllo senza demenza (ND) e un soggetto rappresentativo con AD (AD) sono state valutate mediante Western blotting per NH₂ 4268

25 tau (aa26-36) (H), cyt C(I), SOD-I (L) e normalizzate a HSP70 mitocondri-specifico (M). N-O): è mostrata una microscopia immunoelettronica (TEM) della localizzazione mitocondriale del frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa in un cervello umano di un soggetto con AD (O) e di un controllo senza demenza, age-matched (N). Marcatura immunogold rappresentativa (di n=3) con anticorpo NH₂ 4268 tau (aa26-36) purificato per

30 affinità (frecce) mitocondri fortemente colorati in neuroni degeneranti di un cervello con AD. Pre-assorbimento di anticorpo con il peptide sintetico NH₂-26-44 ha eliminato la marcatura (non mostrato). Barra di calibratura di 0,2 μ m.

Figura 5. Gli estratti solubili di omogeneizzati di cervello con AD contenenti oligomeri A β inducono neurotossicit  e la produzione del frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa attraverso l'attivazione della(e) caspasi in SY5Y umano differenziato. A-B): Caratterizzazione biochimica di oligomeri A β nativi arricchiti
5 mediante estratti proteici grezzi solubili di cervelli con AD e senza demenza, age-matched, preparati come riportato da [57], che non contenevano pressoch  monomeri A β , data la capacit  di queste specie a basso peso molecolare di passare prontamente attraverso il filtro di cutoff da 10 kDa alle condizioni utilizzate qui. Campioni estratti da due diversi esemplari di cervello con AD sono stati raggruppati e i retentati - ottenuti mediante filtri di
10 cutoff da 10 kDa (Vivaspin 4 VS0403) - sono stati aggiunti alla coltura cellulare a una concentrazione finale di 1mg/ml. Quantit  uguali di proteine sono state separate mediante separazione PAGE nativa, tris-glicina al 12% (non-denaturante) con standard proteico non colorato nativo (Invitrogen LC0725). Campioni non riscaldati sono stati applicati sul gel in due file diverse e dopo il trasferimento la membrana   stata tagliata in due parti uguali e
15 queste analizzate in parallelo. Western blot con anticorpi A11 conformazione-dipendente (B) e 6E10 non-conformazione-dipendente (A) mostra un passaggio verso forme oligomeriche pi  grandi di peptidi A β , dimostrando che omogeneizzati solubili con AD contenevano una miscela di trimeri e oligomeri A β a peso molecolare superiore (HMW). Proteine si diffondono in regioni HMW che hanno reagito con l'anticorpo specifico per
20 A11 e questa diffusione in campioni ND era soltanto debolmente rilevabile (A, si confronti la fila 1 con la 2). C) cellule di neuroblastomi umane di SH-SY5Y umano dbAMPc/NGF-differenziato sono state incubate per 12 h con 1mg/ml di supernatanti contenenti oligomero F12 di omogeneizzati grezzi di cervelli con AD (SBH) [60], cos  come di controlli senza demenza, oppure con 10 μ M di peptide sintetico A β 1-42 , in assenza o in presenza di
25 100 μ M di Z-VADfmk o 20 μ M di MDL28170, rispettivamente un inibitore di pan-caspasi o calpaina-I. La conta di nuclei intatti (non mostrata)   stata anche eseguita in parallelo per monitorare la vitalit  delle colture neuronali dopo il trattamento (non mostrato). Western blot mostrano l'immunioreattivit  dei lisati proteici esaminati con anticorpo NH₂ 4268 tau (aa26-36). Quantit  di proteina identiche (25 μ g) sono state applicate a ciascuna fila. Come
30 controllo di carico   stata utilizzata α -tubulina per consentire un confronto diretto tra la massa proteica totale applicata alle diverse file. Il pannello mostra la quantificazione del rapporto tra il frammento di tau 20-22 NH₂ troncato/ α -tubulina espresso come percentuale

rispetto al controllo. Ciascun dato è la media \pm SE (barre) di cinque esperimenti indipendenti e differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante test t di Student appaiato (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). D-E-F) cellule di neuroblastomi umane di SH-SY5Y dbAMPc/NGF-differenziato sono state incubate per 12 h con 1mg/ml di supernatanti contenenti oligomero F12 di omogeneizzati di cervello con AD (SBH) [60], in
5 assenza o in presenza di 100 μ M di inibitore pan-caspasi Z-VADfmk. Quantità di proteine uguali (25 μ g) sono state applicate a ciascuna fila e α -tubulina è stata utilizzata come controllo di carico. Western blot mostrano l'immunoreattività di lisati proteici esaminati con anticorpo NH₂ 4268 tau (aa26-36)(D), caspasi-3 (E) clivata e COXIV (F). G-H) cellule
10 di neuroblastomi umane di SH-SY5Y umano dbAMPc/NGF-differenziato sono state mantenute per 12 h a 37°C con 1mg/ml di supernatanti contenenti oligomero F12 di omogeneizzati senza demenza e con AD presi da due cervelli diversi (SBH), in assenza o in presenza di 100 μ M di Z-VADfmk, 2 μ g/ml di 6E10, 2 μ g/ml di anticorpo A11 [60]. Se presenti, l'inibitore e gli anticorpi sono stati aggiunti a colture 30 min prima dell'aggiunta
15 di SBH. Quantità proteiche uguali (25 μ g) sono state applicate a ciascuna fila e α -tubulina è stata utilizzata come controllo di carico. Western blot mostrano l'immunoreattività dei lisati proteici esaminati con anticorpo NH₂ 4268 tau (aa26-36) (G) e α -tubulina. Il pannello (H) mostra la quantificazione del rapporto tra il frammento di tau 20-22 NH₂ troncato tau fragment/ α -tubulina espresso come percentuale rispetto al controllo. Ciascun dato è la
20 media \pm SE (barre) di tre esperimenti indipendenti e differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante test t di Student appaiato (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figura 5Bis. Caratterizzazione biochimica di terreni condizionati derivati da neuroni di SY5Y differenziato umano incubato con 10 μ M di A β 1-42 umana, sintetica ed estratti di cervelli solubili (SBH) con AD arricchiti in oligomeri. A-B) Neuroni di
25 SY5Y umano differenziato sono stati incubati per 12h soltanto con veicolo, con 10 μ M di A β 1-42 solubile umana (61), con 1mg/ml di AD-SBH [60]. Quantità uguali di terreno non riscaldato e privo di DTT, condizionato, sono state caricate per file e sottoposte ad analisi Western blotting. Dopo risoluzione su SDS-PAGE (tris-glicina al 4-12%) e colorazione con Ponceau per verificare il carico delle proteine omogeneo, il filtro è stato esaminato con
30 anticorpo 6E10 (anti-A β 4-9). Si noti che il terreno condizionato di colture esposte a peptide A β conteneva una miscela di dimeri solubili SDS-stabili, trimeri/tetrameri mentre una debole immunoreattività di specie oligomeriche A β era presente nel terreno di neuroni

trattati con AD-SBH, che invece conteneva α APP e APP di lunghezza completa (A). Tuttavia, diversi aggregati A β , 6E10-immunoreattivi, SDS-stabili, che teoricamente corrispondevano a multipli trimerici (14-kDa), esamerici (27 kDa), nonamerici (40 kDa) e dodecamerici (56 kDa) e HMW di gruppi A β 1-42 (50-75kDa), sono stati contestualmente rilevati nella preparazione AD-SBH arricchita in oligomeri (5BISB, sinistra), suggerendo il fatto che dopo trattamento dei neuroni di 12h, tali aggregati erano ampiamente legati a membrana *in vitro* oppure collocati all'interno (130,173). Infine, con eventuale denaturazione, attraverso una leggera bollitura o una bassa concentrazione di agenti di riduzione, cioè DTT, la diffusione di proteine nella regione HMW è scomparsa in concomitanza con un aumento parallelo dei livelli di esameri e, in misura minore, di specie A β tetrameriche/trimeriche (5BISB, destra). Complessivamente, questi risultati suggeriscono che (i) i complessi A β 6E10-positivi sono tenuti insieme mediante legami idrogeno SDS-resistenti oppure legami covalenti S-S. In aggiunta, come riportato precedentemente in [75], la grande resistenza di trimeri/tetrameri a condizioni denaturanti confermava che questi aggregati A β sono l'unità di raggruppamento primaria A β in vivo. Le frecce indicano rispettive posizioni di migrazione di monomeri (1-mero), dimeri (2-mero), trimeri (3-mero), tetrameri (4-mero), esameri (6-mero), nonameri (9-mero), dodecameri (12-mero) e sAPPA (forma secreta di APP che è stata clivata con a-secretasi). L'asterisco indica la diffusione della proteina nella regione a elevato peso molecolare intorno a 50-75 kDa.

Figura 6. Il frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa è anche presente in altre tauopatie non AD, umane, caspasi-dipendenti, mentre la sua presenza è correlata a multimeri A β e alla gravità della patologia in pazienti con AD.

Analisi Western blotting con anticorpi NH₂ 4268 tau (aa26-36) (1:2000)(A), caspasi-3 clivata (B), 6E10 (C), AT8 (D) e PHF13 (E) con quantità proteiche uguali (20 μ g) di frazioni sinaptosomiali di controllo (n=1), AD (n=4), DLB (n=1), PiD (n=1). I livelli del frammento di tau 20-22 kDa NH₂-derivato, eccetto in pazienti giovani (A, fila 3), sono significativamente aumentati in tutti i casi in cui è presente la patologia rispetto al controllo (A) e correlati con la presenza della forma di caspasi-3 attiva (B). L'assenza di accumulo o un accumulo limitato di agglomerati oligomerici A β 6E10-positivi è stata/o rilevata/o in tauopatie non-AD (C, file 6-7), che effettivamente presentano un'iperfosforilazione della tau patologica a livelli paragonabili ad altri casi di AD analizzati (D-E si confrontino file 6-

7 con file 2,3,4,5,6). Si noti anche che non sono stati ritrovati aggregati A β e caspasi-3 attiva in sinaptosomi di soggetti giovani (fila 3), che erano affetti da AD medio/moderato e non presentavano un livello significativo del frammento di tau NH₂ 20-22 kDa.

Figura 7. A) Western blotting che confronta lisati proteici sinaptosomiali di soggetti ND, AD immunoprecipitati (IP) ed esaminati (WB) con CCP-NH₂ 4268 tau (NH₂ aa26-36 di tau umana). Gli estratti proteici totali di SY5Y neuronale, trattato con STS per 6h, e proteine sinaptosomiali AD (INPUT) sono anche stati caricati per fila e inclusi come controllo interno positivo di mobilità elettroforetica. Gli asterischi indicano le catene pesanti e leggere di immunoglobuline in immunoprecipitati.

B-C-D-E) Western blotting che confronta lisati proteici sinaptosomiali di soggetti ND, AD immunoprecipitati (IP) con antisiero di CCP-NH₂ 4268 tau (NH₂ aa26-36 di tau umana) (B) ed esaminati (WB) anticorpo ANT1 (almeno 12 amminoacidi di ANT1 neuronale umano C-terminali) (C), con citocromo C (D) e con α -sinucleina (E). Analisi densitometrica della banda di immunoreattività di ANT1 è stata espressa come percentuale di campioni di controllo in cui il controllo ha un valore pari a 1. Ciascun dato è la media \pm SE (barre) di esperimenti indipendenti (n=3) e differenze statisticamente significative sono state calcolate mediante test t di Student appaiato (**p<0.01). B-D)

F-G) Immunoprecipitazione reciproca che confronta lisati proteici sinaptosomiali di soggetti ND, AD, immunoprecipitati (IP) con anticorpo topo immunocapture ANT1 (almeno 12 amminoacidi di ANT1 neuronale umano C-terminali). Gli immunocomplessi sono stati esaminati con antisiero di CCP NH₂ 4268 tau (NH₂ aa26-36 di tau umana).

Figura 8. Western blotting di 0,3 ml di CSF liofilizzato di un paziente con AD con NH₂ 4268 tau (NH₂ aa26-36 di tau umana) indica anche la presenza del frammento di tau-NH₂ di 20-22 KD in questo fluido biologico.

25 DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

MATERIALI E METODI

Considerazioni etiche

Questo studio è stato eseguito in accordo con la commissione etica locale e con i principi contenuti nella Dichiarazione di Helsinki revisionata nel 1996. Tutti gli animali sono stati trattati e curati nel rispetto della linee guida CEE (Direttiva 86/609/CEE). Tutte le dichiarazioni riguardanti le considerazioni etiche sono riportate nella sezione Etica.

Materiale cerebrale

Il materiale cerebrale umano è stato reperito attraverso il programma di autopsia rapida della Netherlands Brain Bank (NBB), che fornisce esemplari post-mortem di casi ben documentati a livello clinico e confermati a livello neuropatologico. (Tabella 1). Tutte le
5 ricerche con l'utilizzo di tali esemplari sono state condotte in base alla dichiarazione etica della Netherlands Brain Bank. L'approvazione etica e il consenso informato scritto dei donatori o dei parenti stretti sono stati ottenuti in tutti i casi. Il lavoro della NBB è conforme al codice etico approvato dalla commissione etica. La diagnosi clinica di AD probabile è stata effettuata sulla base dei criteri NINCDS-ADRDA [50] ed è stata
10 classificata la gravità della demenza mediante la scala di deterioramento globale (Global Deterioration Scale). Tutti i casi sono stati confermati a livello neuropatologico con l'utilizzo di tecniche istopatologiche convenzionali ed è stata effettuata una diagnosi utilizzando criteri CERAD [51]. Controlli senza patologia non avevano storia o sintomi di disturbi neurologici o psichiatrici e non erano clinicamente affetti da demenza. Tutti i casi
15 in gruppi di controllo sono gentilmente forniti dal professor Bussani di UCO Anatomia e Istologia Patologica- Ospedale di Cattinara Trieste. Tutti i casi di essere umani non affetti da demenza sono recuperati dai file relativi ad esemplari autoptici dell'Ospedale di Cattinara-Trieste, con l'approvazione della commissione etica locale. Informazioni dettagliate sui soggetti (età, lasso di tempo post-mortem, numero di autopsia e peso del
20 cervello utilizzati approssimativamente per ciascun singolo esperimento) sono mostrate nella Tabella 1 e non sono presenti differenze statisticamente significative tra controlli non affetti da demenza e pazienti analizzati. Per minimizzare le considerevoli differenze regionali nella patologia, gli autori hanno scelto di utilizzare ippocampo e/o corteccia frontale, analizzati insieme, in tutti i pazienti testati. Un campione di CSF è stato prelevato
25 mediante iniezioni lombari seguendo lo standard ed è stato anche fornito dalla Netherlands Brain Bank (NBB).

Animali

Ratti di Wistar giovani (3 mesi) e più vecchi (15 mesi) sono originari dal ceppo inbred Tg2576 (APP695 umano con sovraespressione utilizzato come modello AD). Esemplari
30 della stessa nidiata non transgenici sono stati utilizzati come controllo. Tutti gli animali sono stati trattati e curati nel rispetto delle linee guide dell'Unione Europea.

Frazionamento sinaptosomiale

Frazioni di cervello subcellulari, arricchite in sinaptosomi, sono state preparate in base a [52]. Queste frazioni, come descritto da altri [53], sono ampiamente arricchite nelle proteine sia pre- che post-sinaptiche come PSD95 e GluR2/3. In breve, il cervello umano è stato omogeneizzato in 2 ml di tampone di omogeneizzazione (320 mM sucrosio/ 4 mM Hepes, pH7.4/ 1mM EGTA/ 0.4 mM PMSF/ più cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma P8340) e cocktail di inibitori della fosfatasi (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada P5726/P2850) con 15 corse di un tritratore di tessuti Dounce di vetro (Wheaton). Il prodotto omogeneizzato è stato centrifugato a 1000Xg per 10 min. Il supernatante è stato raccolto e centrifugato a 12000Xg per 15 min, e il secondo pellet è stato risospeso in 2 ml di tampone di omogeneizzazione e centrifugato a 13000xg per 15 min. Il pellet risultante è stato risospeso in 0,3 ml di tampone di omogeneizzazione.

Isolamento di mitocondri

L'estrazione mitocondriale è stata eseguita utilizzando il kit per l'estrazione mitocondriale (Qiagen 37612) in base alle istruzioni fornite dal produttore. In breve, il cervello umano è stato omogeneizzato in 0,5 ml di tampone di omogeneizzazione con l'utilizzo di un rotore-statore di un disgregatore di tessuti e incubato in un agitatore a rotazione end-over-end per 10 min a 4°C. Il prodotto omogeneizzato è stato centrifugato a 1000xg per 10 min a 4°C. Il pellet risultante è stato risospeso in un tampone di disgregazione, fatto passare ripetutamente attraverso un ago a passo stretto (passo 26 o 21), e nuovamente centrifugato a 1000 X g per 10 min; il pellet contiene nuclei, detriti cellulari, e cellule integre. Il supernatante, che contiene mitocondri, è stato nuovamente centrifugato a 6000 X g per 10 min. Il pellet mitocondriale è stato risospeso in un tampone di purificazione di mitocondri e il tampone di disgregazione è stato pipettato lentamente al di sotto del tampone di purificazione. La sospensione mitocondriale è stata pipettata sulla parte superiore degli strati ed è stata centrifugata a 14000 X g per 15 min a 4°C. Il pellet mitocondriale è stato risospeso nel tampone di stoccaggio di mitocondri.

Preparazione degli estratti proteici totali di cervelli umani

Per l'analisi di estratti proteici totali di cervelli [54], blocchi (circa 0.1 g) di tessuto congelato sono stati dissezionati in 5 vol. di tampone di lisi (20mM Tris pH 7.4 più inibitori della proteasi), omogeneizzati su ghiaccio e centrifugati a 13.000 X g per 15 min. Il supernatante è stato quantificato e analizzato mediante SDS-PAGE e Western blot.

Isolamento di tau da campioni bioptici di cervello umano

La tau è stata isolata da campioni bioptici di cervello umano secondo [55]. In breve, i campioni di cervello sono stati omogeneizzati in un tampone di riagglomerazione ghiacciato (0.1 M MES, 0.5 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 2mM ditioneitololo pH 6.8, 0.75 M NaCl più cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma P8340) e cocktail di inibitori della fosfatasi (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada P5726/P2850) e centrifugati a 50000Xg per 30 min a 4°C. Il supernatante è stato bollito per 10 min e nuovamente centrifugato a 50000Xg per 30 min. Il supernatante è stato poi raccolto. La concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il kit per il saggio delle proteine Bio-Rad RC DC.

10 **Solubilità della tau**

La solubilità della tau in campioni di cervello umano è stata studiata secondo [56] con modifiche. In breve, i campioni di cervello sono stati omogeneizzati utilizzando tamponi per aumentare la stringenza: (1) tampone A (high salt, 750 mM NaCl, 50 mM tampone Tris, pH 7.2), (2) tampone RIPA (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% deossicolato, e 0.1% SDS, pH 8.0), (3) 2% SDS. In ogni fase i campioni sono stati brevemente sonicate, centrifugate a 45,000 X g per 30 min a 4°C, e i supernatanti sono stati raccolti.

Preparazione di estratti di cervello solubili arricchiti in accumuli di A β solubili

Gli estratti di cervello sono stati prelevati in base a [57]. In breve, i campioni di cervello sono stati omogeneizzati in 20 volumi di F12 più cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma P8340) e cocktail di inibitori della fosfatasi (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada P5726/P2850) utilizzando un disgregatore di tessuti (GLH 220, Omni International) e sono stati centrifugati a 100000 X g per 1 h. Il supernatante è stato raccolto e il pellet è stato nuovamente omogeneizzato in 10 volumi di F12 più cocktail di inibitori delle proteasi e cocktail di inibitori della fosfatasi ed è stato centrifugato. I supernatanti combinati sono stati raccolti e sono stati concentrati utilizzando un concentratore Centricon-10 (Vivaspin 4 VS0403 10,000 MWCO PES).

TEM (Microscopia elettronica a trasmissione)

I campioni sono stati tagliati in piccoli pezzi (1-2 mm³), fissati con paraformaldeide al 4% più glutaraldeide allo 0,5% in PBS, pH 7.4, per 24 h a 4°C, lavati in PBS e successivamente infiltrati con 2,3 M di sucrosio in PBS durante la notte a 4°C, congelati in azoto liquido e criosezionati seguendo il metodo di Tokuyasu (1973) [58]. Criosezioni ultrasottili, ottenute con l'utilizzo di un dispositivo Leica Ultracut UCT (Leica

Microsystem, Vienna, Austria), sono state raccolte utilizzando sucrosio e metilcellulosa e incubate durante la notte a 4°C con l'anticorpo della tau specifico, primario, purificato per affinità NH₂ 4268 e successivamente gold-coniugate con 5 nm di IgG anti-umano (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Infine, criosezioni ultrasottili sono state colorate con
 5 metilcellulosa al 2% e una soluzione di uranile acetato allo 0,4%. I campioni sono stati esaminati con un microscopio elettronico a trasmissione Philips 208 (FEI Company, Eindhoven, Olanda).

Coltura cellulare e trattamenti

Cellule di neuroblastomi umane SH-SY5Y (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.) sono state coltivate in terreno DMEM/F12 (Invitrogen, Gibco BRL 31331-028) integrato con siero fetale di vitello al 10% (Invitrogen, Gibco BRL 10108-157), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina (Invitrogen, Gibco BRL 15140-122) e mantenute a 37°C in un'atmosfera satura di umidità contenente il 95% di aria e il 5% di CO₂. Il terreno è stato cambiato ogni due giorni. Cellule naive con una confluenza del 20%
 15 sono state differenziate mediante incubazione per 5-6 giorni in terreno DMEM/F12 contenente N2 (Invitrogen, Gibco BRL 17502-048), dbcAMP 1 mM (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada-D-0627) e NGF 100 ng/ml. Per tutti i trattamenti i terreni con additivi sono stati cambiati dopo 1 e 3 giorni. Si è indotta apoptosi aggiungendo staurosporina (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada S-4400) (0.5 µM), preparata
 20 come una soluzione madre in dimetilsolfossido (DMSO), in 6 ore.

I neuroni ippocampali sono stati preparati da embrioni di 17-18 giorni (E17/E18) da ratti di Wistar gravidi (Charles River), come riportato precedentemente da [59]. Nel dettaglio, l'ippocampo è stato dissezionato in una soluzione salina bilanciata di Hanks tamponata con HEPES e dissociato mediante trattamento con tripsina/EDTA. Le cellule sono state
 25 piastrate a 1×10^6 cellule su dischetti di 3,5cm pre-rivestiti con poli-DL-lisina. Dopo 2 giorni di coltura in terreno neurobasale con supplemento B-27 e glutamax, è stata aggiunta citosina arabinofuranoside per ridurre la proliferazione gliale. Metà del terreno è stato cambiato ogni 3-4 giorni. Le colture sono state pre-trattate con ZVAD-fmk (100µM), MDL28170 (20µM) alla concentrazione riportata per 1h e successivamente esposte a
 30 omogeneizzati di cervello contenenti oligomeri (1mg/ml)+inibitore per un tempo supplementare, come riportato precedentemente da [60] (si veda la legenda della figura). Per il trattamento con Aβ 1-42 di neuroni ippocampali [61], si è ottenuta 1nM di una soluzione madre sciogliendo Aβ1-42 in DMSO:H₂O (1:1) e quantità simili di DMSO sono

state incubate nel terreno campione di controllo. Tutti gli esperimenti sono stati realizzati mediante incubazione di colture con 10 μ M A β 1-42 per 12h. Oligomeri A β sintetici sono stati preparati come descritto da [62] e utilizzati alla concentrazione finale di 2.5 mM.

Valutazione della vitalità neuronale

- 5 La vitalità cellulare è stata quantificata contando il numero dei nuclei intatti dopo la lisi in una soluzione contenente detergente [63].

Preparazione di lisati cellulari proteici.

- Proteine totali sono state estratte raschiando le cellule in un tampone di riduzione di SDS o mediante lisi in un tampone di RIPA ghiacciato (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 2 mM EDTA, 0,1% SDS più cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma P8340) e cocktail di inibitori della fosfatasi (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada P5726/P2850) e centrifugate a 4 °C per 15 min a 1000 X g. Il supernatante è stato poi raccolto e fatto bollire per 5 min. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il kit per il saggio di proteine Bio-Rad RC DC.
- 10

15 Analisi Western blot

- Quantità uguali di proteina sono state sottoposte a SDS-PAGE con gradiente lineare 7,5-15% di Tris/Tricina 4-12%(NuPage, Invitrogen). Dopo elettroblotting su una membrana di nitrocellulosa (Hybond-C Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) i filtri sono stati bloccati in PBS contenente latte scremato essiccato al 5% per 1h a temperatura ambiente oppure durante la notte a 4°C. Le proteine sono state visualizzate utilizzando anticorpi primari adatti. Tutti gli anticorpi primari sono stati diluiti in latte essiccato scremato allo 0,5% (w/v) e incubate con il blot di nitrocellulosa durante la notte a 4°C. L'incubazione con anticorpi anti-topo, anti-coniglio o anti-capra secondari, accoppiati con perossidasi è stata effettuata utilizzando il sistema ECL (Amersham, Arlington Heights, IL, U.S.A.). Poiché anticorpi differenti hanno affinità diverse per la tau [55], la quantità della proteina totale caricata e la concentrazione dell'anticorpo primario utilizzato sono specificate nella legenda della figura oppure in materiale e metodi. Il software Quantity One, associato con il sistema per immagini versaDoc (Bio-Rad), è stato utilizzato per quantificare bande risultanti di interesse. Gel nativi sono stati utilizzati in assenza di SDS e agenti di riduzione e senza campioni di riscaldamento.
- 20
- 25
- 30

Filtri esaminati sono stati strappati utilizzando un tampone di strappaggio (100mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) a 50°C per 30 minuti con agitazione occasionale.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:

anticorpo coniglio di tau NH₂-CCP (D25-(QGGYTMHQDQ) (aa 4 to 14 of SEQ ID No. 2) (stato indipendente da fosforilazione di epitopi) (1:500); NH₂-Tau 4268 (aa 26-36 epitopi) coniglio Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada (1:1000); HT7 (aa159-163 indipendente da fosforilazione di epitopi) topo 90222 Immunogenetics, Autogen Bioclear, UK(1:1000); AT100 (Thr 212,Ser 214 stato dipendente da fosforilazione di epitopi) topo 90209 Immunogenetics, Autogen Bioclear, UK(1:1000); AT8 (Ser-202, Thr-205 topo stato dipendente da fosforilazione di epitopi) Innogenetics (1:1000); PHF13 (Ser396 stato dipendente da fosforilazione di epitopi) topo Innogenetics (1:1000); AT180 (Thr-231 stato dipendente da fosforilazione di epitopi) topo 90337 Immunogenetics, Autogen Bioclear, UK(1:1000); DC39N1 (aa 45-73 epitopi, primo inserto N-terminale) topo T8451 Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada (1:500); Tau 13 (aa1-13) topo sc-21796 Santa-Cruz Biotechnology, USA(1:1000); tau 21 (aa21-36) coniglio AHB0371 Biosource International (USA) (1:250); Alz50 il topo è stato gentilmente fornito da Dr. V. Lee (Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA); proteina anti-amiloide β 4G8 (aa 17-24) topo MAB1561 Chemicon (1:1000); proteina anti-amiloide β 6E10 (aa 4-9) topo MAB1560 Chemicon (1:1000); A11 anti amiloide beta, micellare (oligomero) coniglio AB9234 Chemicon, Temecula, CA (1:1000); proteina del precursore anti-Alzheimer 22C11 (aa66-81 di N-terminus) APP-MAB348 Chemicon Temecula-CA (1:1000); clivato (Asp175) anticorpo coniglio caspasi-3 9661 Cell Signaling Technology, Beverly, MA (1:1000); anti α -sinucleina (Ser 129) coniglio Imgenex, (1:1000); anticorpo α -sinucleina topo 610787 BD Transduction Laboratories (1:1000); ANT (traslocasi nucleotidica anti-adenina) topo AP 1034 Calbiochem San Diego, CA (1:200); fosfo-cofilina (Ser3) anticorpo coniglio 3311 Cell Signaling Technology, Beverly, MA (1:1000); citocromo c (136F3) coniglio 4280 Cell Signaling Technology, Beverly, MA (1:200); anticorpo Fyn coniglio 4023 Cell Signaling Technology, Beverly, MA (1:1000); GAPDH (clone GAPDH-71.1) topo G8795 Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada (1:5000); PSD95 anticorpo coniglio 2507 Cell Signaling Technology, Beverly, MA (1:1000); SNAP 25 (proteina associata sinaptosomiale di 25kDa, C-terminale-specifica) coniglio SL3730 Biomol International, LP (1:1000); anticorpo di sinapsina I coniglio AB1543P Millipore Corporation, Billerica, MA (1:1000); anticorpo di sinaptofisina topo VAM-SV011 Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC Canada (1:1000); anticorpo di PS1 topo SIG-39190 Covance, Princeton, NJ

(1:1000); SOD II (MnSOD, superossido dismutasi mitocondriale) coniglio SOD-110D Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC Canada (1:5000); SODI (cn/ZnSOD, superossido dismutasi citosolica) coniglio SOD-100D Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC Canada (1:5000); mtHSP70 (proteina heat shock antimitochondriale 70) topo MA3-028 Affinity Bioreagents, Rockford, IL (1:500); sottounità I anti-COXIV topo A6403 Molecular Probes (1:500); anti- α -actinina-2 coniglio sc130928 SantaCruz Biotechnology,USA (1:5000); α -tubulina topo T-5168 Sigma–Aldrich (1:1000); β -actina topo S3062 Sigma-Aldrich (1:5000); ANT (H-188) coniglio sc-11433 Santa Cruz (1:500); ANT (5F51BB5AG7) topo AP1034 Calbiochem (1:200); immunocapture anticorpo ANT (clone 5F51BB5AG7) topo Mitosciences MSA01.

Immunoprecipitazione

I campioni (600 μ g estratti totali di proteina SY5Y e frazionamento sinaptosomiale umano) sono stati sottoposti a lisi utilizzando immunoprecipitazione (IP) tampone (50mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl, 10% glicerolo, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 50mM NaF, 1mM NaOV₄, 1% NP40) integrato con cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma P8340) e cocktail di inibitori della fosfatasi (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada P5726/P2850). I lisati sono stati centrifugati a 4°C per 10 min a 3000 giri al minuto e i supernatanti sono stati pre-depurati utilizzando 5 μ l di proteina G (Invitrogen 100.03) per 1h a 4°C. Gli estratti proteici pre-depurati sono stati immunoprecipitati mediante cross-linking degli anticorpi di Ig con la proteina G su una superficie granulare - in base alle istruzioni del produttore- con 4 μ g di CCP- NH₂ 4268tau per 10 μ l di proteina G e diluiti con tampone Laemmli 1X più DTT (Invitrogen). Gli immunocomplessi sono stati poi analizzati mediante immunoblotting con anticorpo ANT (1:200) di Calbiochem (clone 5F51BB5AG7).

L'immunoprecipitazione reciproca è stata eseguita con 50 μ l di anticorpo topo ANT immunocapture (clone 5F51BB5AG7) di Mitosciences (MSA01) per 1,5 mg di estratto proteico mitocondriale, seguendo le istruzioni del produttore. Gli immunocomplessi sono stati poi analizzati mediante immunoblotting con tau CCP- NH₂ 4268 (1:600).

Analisi statistica

Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicati e ripetuti almeno per tre volte. I dati sono stati espressi come medie +/- S.E. (n=3). Le differenze tra il gruppo di controllo e quello dei soggetti trattati sono state analizzate con il software GraphPad prism 4.0 mediante test *t* di Student. Le differenze statistiche sono state determinate a $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$) e

sono riportate nelle legende delle figure. Per l'analisi Western blot gli studi mostrati erano rappresentativi per almeno tre esperimenti separati.

RISULTATI

5 **La localizzazione biochimica di un frammento di tau umana NH₂ in sinapsi umana(e) con AD**

Gli autori hanno esaminato l'espressione biochimica *in vivo* e la distribuzione subcellulare del frammento di tau NH₂-derivato 20-22 kDa in frazioni arricchite in sinapsi ottenute mediante frazionamento biochimico di sinaptosomi [52] di tessuti umani. A tale scopo, sono stati analizzati campioni autoptici crioconservati di aree del cervello umano, ottenuti da pazienti con diagnosi clinica a istopatologica di AD e da un gruppo di controllo di anziani non affetti da demenza. I dati demografici (età, lasso di tempo post-mortem, area del cervello e peso relativo) e la diagnosi neuropatologica sono mostrati nella tabella 1 e non erano presenti differenze statisticamente significative tra gruppi di controllo non affetti da demenza e pazienti con AD.

Tabella 1. Casi di AD confermato da autopsia e soggetti di controllo sani utilizzati in questo studio.

Tabella redatta di tutti casi analizzati per il gruppo definito a livello patologico. Morbo di Alzheimer: AD; morbo di Pick: PiD; DLB: demenza a corpi di Lewy; ND soggetti di controllo sani, non affetti da demenza. Il peso del cervello indica approssimativamente la quantità di tessuto utilizzata per ciascun singolo esperimento.

Casi post-mortem	N. di casi	Stadio di Braak	(Intervallo di) età (anni)	Intervallo post-mortem (min)	Regione usata	Peso del cervello (mg)
ND	5	0-I	50-70	540	ippocampo, corteccia	250-300
AD	8	V-VI	65-90	225-310	ippocampo, corteccia	200-400
AD in giovani	1	II-III	49	250	ippocampo, corteccia	200-300
DLB	1	/	84	365	corteccia temporale	200
PiD	1	/	72	235	ippocampo	300

Gli autori hanno scelto l'ippocampo e/o la corteccia cerebrale in tutti i pazienti sottoposti al test, in quanto, come documentato da dati di neuroimaging metabolici/molecolari e test clinici, i danni in queste aree selettive del cervello in AD sono correlati ad alcune delle

relative anomalie amnesiche e comportamentali [64-66]. In aggiunta, è stato proposto che la perdita di sinapsi in tali aree del cervello rappresenta la compromissione neurobiologica o cognitiva più grave in AD [1,2,67].

La purezza della presente preparazione frazionata è stata testata per verificare che fosse effettivamente arricchita in terminali sinaptici e che fosse priva di contaminazioni di pericaria neuronali. A tale scopo gli autori hanno analizzato mediante Western blotting il livello di espressione di proteine specifiche presinaptiche, postsinaptiche e di corpi cellulari in estratti totali e sinaptosomiali di controlli umani. Come mostrato nella figura 1, la proteina presinaptica sinaptofisina (fig.1A) e le proteine postsinaptiche PSD95 (fig.1B) erano altamente arricchite nella preparazione sinaptosomiale degli autori. Al contrario, GAPDH, una proteina presente nel corpo cellulare (fig.1C) è stata ritrovata in quantità maggiori nell'estratto cerebrale totale rispetto alla preparazione sinaptosomiale. Inoltre, differenze nel livello di intensità di elementi citoscheletrici come α -actinina-2 (fig.1D) e β -actina (non mostrata), non sono state rilevate nella preparazione degli autori tra estratti proteici totali e arricchiti in sinaptosomi, in base a [68-70].

Per i loro esperimenti seguenti gli autori hanno deciso di utilizzare un anticorpo NH₂ tau concepito *ad-hoc*, fotoindipendente, denominato da qui in poi NH₂ 4268 tau. Questo antisiero coniglio-derivato riconosce i 26-36 epitopi collocati nel dominio di estremità NH₂ della proteina tau umana analogamente all'anticorpo CCP-NH₂ tau [35,46], ma tau di lunghezza completa non è pre-assorbita (per la specificità anticorpale si veda la figura S1). Gli autori hanno confrontato mediante Western blotting con questo anticorpo specifico NH₂ tau [35,46] i livelli di espressione di un frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa in estratti proteici totali e in quelli arricchiti in sinapsi di cervelli umani malati e di controllo. Come mostrato nelle figure 1E-F, contrariamente a estratti di cervello totali in cui erano rilevabili isoforme di tau di lunghezza completa (fig.1E), gli autori hanno scoperto una distribuzione preferenziale del frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa [46] in compartimenti sinaptici (fig.1F) e- aspetto più interessante- un livello di espressione significativamente superiore di questa forma di tau troncata in sinaptosomi AD rispetto a controlli age-matched non affetti da demenza. È interessante che l'anticorpo NH₂ 4268 tau riconosca mediante Western blotting una doppietta immunoreattiva che va da 20 a 30 kDa in sinaptosomi di casi di AD e – con meno intensità – di casi senza demenza. Inoltre, come mostrato nella figura 1G, la banda risolta migrante velocemente è più abbondante di quella più lenta in AD (n=15) ma non nel controllo (n=10) (circa 9-10 volte superiore). Non è

chiaro se la doppietta si genera dal clivaggio nei due siti adiacenti di caspasi nel dominio tau NH₂, cioè caspasi-3 e -6 [35,71], oppure se rappresenta una modifica post-traslazionale di un singolo frammento di tau NH₂, cioè ubiquitinazione/fosforilazione. In alternative, poiché il più grande dei due frammenti proteolitici ha un segnale più forte nel Western blot

5 in correlazione alla debole immunoreattività di quello più piccolo, è possibile che l'ultimo frammento rappresenti un elemento intermedio del processo proteolitico. In aggiunta, come mostrato nella figura 1F, la forma di tau troncata NH₂-derivata, localizzata sulla sinapsi presentava una mobilità elettroforetica e un'immunoreattività simili con l'anticorpo NH₂ 4268 tau al frammento *in vitro* di cellule umane SH-SY5Y differenziate [46] che subisce

10 un'apoptosi caspasi-dipendente in seguito al trattamento di 6h con staurosporina [72,73]. Un modello simile di localizzazione sinaptica è stato rilevato per caspasi-3 attiva secondo Louneva et al., 2008 [70], come mostrato esaminando gli estratti umani frazionati con antisieri diretti contro le rispettive forme clivate di enzimi (fig.1H-I). Considerati insieme, questi dati dimostrano chiaramente che entrambe le specie di tau NH₂-derivata erano

15 debolmente osservate in estratti umani di omogeneizzati di cervello totali, se il filtro era esposto per un tempo necessario al rilevamento di isoforme della proteina tau 55-75kDa di lunghezza completa, grazie alla loro distribuzione preferenziale in compartimenti sinaptici. Sulla base di questi risultati, gli autori hanno deciso di focalizzare la loro attenzione in esperimenti incentrati prevalentemente sul frammento di peso molecolare inferiore di tau

20 20-22 kDa NH₂.

Poiché oligomeri di A β 1-42 pre-fibrillari, solubili, determinano neurotossicità in porzioni di ippocampo organotipiche di ratti stimolando l'attivazione della caspasi-3 e il clivaggio della tau [74], gli autori hanno testato se la presenza del frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa in compartimenti sinaptici con AD era associata a specie di A β neurotossiche.

25 Pertanto gli autori hanno fatto reagire i loro estratti arricchiti di sinapsi frazionati di cervelli malati e di controllo con 6E10, un anticorpo diretto contro la porzione extracellulare del dominio A β all'interno della proteina del precursore di amiloide A β PP (residui 4-9 di A β umana). Come mostrato nella figura 1F-L, gli autori hanno scoperto in

30 compartimenti sinaptici con AD – ma non nel controllo umano age-matched – il livello sinaptico elevato di 20-22 kDa NH₂ (fig.1F) in correlazione alla presenza del monomero 4kDa A β e di oligomeri a peso molecolare elevato SDS-resistente (HMW) (fig.1L), compreso il monomero 56kDa (A β 56*), del quale precedentemente si è analizzato il contributo in deficit cognitivi in AD compromettendo la memoria, indipendentemente da placche o da

perdita neuronale [75]. Infine, il frammento di tau NH₂ 20-22 kDa è stato anche arricchito in modo selettivo in sinaptosomi di topi di 3 mesi Tg2576 (anche denominati APP₆₉₅SWE), un modello transgenico con AD che mostra deficit sinaptici A β -dipendenti e un potenziamento a lungo termine compromesso (LTP) [13,75], in correlazione a un aumento significativo del livello di caspasi-3 attiva (non mostrato).

Questi risultati indicano che (i) il frammento di tau NH₂-derivato 20-22 kDa è presente a livelli superiori nel cervello con AD ed è localizzato prevalentemente nella/e sinapsi e (ii) la sua distribuzione *in vivo* in compartimenti sinaptici è correlata alla presenza di specie peptidiche di A β neurotossiche e alla forma attiva della caspasi-3.

I livelli elevati del frammento di tau umana NH₂ di 20-22 kDa in sinaptosomi umani sono correlati ad alterazioni sinaptiche AD

Al fine di valutare se la presenza del frammento di tau umana NH₂ è correlata ad alterazioni sinaptiche, gli autori hanno confrontato la sua intensità di immunoreattività con il livello di espressione/distribuzione di marker specifici pre- e post-sinaptici in sinaptosomi di cervelli umani con AD e senza demenza.

Come mostrato nella figura 2, la distribuzione sinaptica del frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa (fig.2A) è stata correlata a una riduzione significativa dell'espressione di α -sinucleina (fig.2B), proteina sinaptosoma-associata di 25kDa (SNAP-25) (fig.2C), sinapsina I (fig.2D). Queste tre proteine sono perlopiù localizzate nei terminali nervosi pre-sinaptici, sono impregnate nel traffico di vescicole e nel rilascio di neurotrasmettitori e la loro immunoreattività neuronale diminuisce negli stadi neuropatologici più avanzati dell'AD [17,22,76-80]. Come invece riportato da altri [81], gli autori hanno contestualmente scoperto un aumento di immunoreattività per PSD95 (fig.2F), una proteina di densità postsinaptica che partecipa alla trasmissione di segnali tra i recettori NMDA e AMPA, probabilmente come conseguenza di uno sviluppo dendritico di compensazione. Inoltre, il livello di espressione di sinaptofisina (fig.2E), un'altra proteina presinaptica che partecipa all'esocitosi di vescicole, era invariato.

La distribuzione locale del frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa in sinapsi con AD umane era correlata ad alterazioni di spine dendritiche, come documentato dall'aumento della cofilina Ser3-fosforilata (fig.2G), una proteina actina-legante che è trovata in corpi di Hirano nel cervello di pazienti con AD [82] ed è coinvolta nella distrofia neuritica A β -mediata [83,84]. Infine, in diretta correlazione alla distribuzione del(i) frammento(i) di tau

NH₂ di 20-22 kDa in sinaptosomi umani con AD, gli autori hanno rilevato un aumento dei livelli sinaptici di p59Fyn (fig.2H). Questa tirosina chinasi della famiglia Src è localizzata in siti sinaptici [85], in quanto è coinvolta in processi di apprendimento e di memoria [86], e si è scoperto che le sue alterazioni sono associate al declino sinaptico in AD, in una stretta colocalizzazione con tau a filamenti elicoidali accoppiati (PHF) [87,88].

Successivamente gli autori hanno cercato di vedere se l'aumento del frammento di tau umano troncato di NH₂ di 20-22 kDa fosse anche correlato a cambiamenti patologici della tau di lunghezza completa, come fosforilazione, conformazione e aggregazione, sottolineando l'evoluzione di grovigli neurofibrillari in AD (NFT). A tale scopo frazioni arricchite in sinapsi sono state esaminate con diversi anticorpi che rilevano alcuni epitopi dell'AD, quali epitopi AT180, PHF13, AT100, AT8 (2I-L-M-N) e Alz50 (non mostrato), che sono correlate alla progressione degli stadi di PHF della malattia [89]. Come mostrato nelle figure 2I-L-M-N e contrariamente al declino di diversi marker sinaptici, l'immunoreattività di cambiamenti di PHF-tau sembra essere fortemente aumentata in sinaptosomi di casi affetti dalla malattia e non sono state rilevate bande di intensità paragonabile nel controllo age-matched, in base agli studi precedenti di altri [44,90]. In aggiunta, un accumulo di specie HMW tau, come conseguenza di aggregazione proteica prima della sua agglomerazione in PHF altamente insolubili, è stato anche riscontrato con anticorpi di tau specifici, fosforilazione-dipendenti (fig.2I-L-M-N-) così come con quelli fosforilazione-indipendenti (fig.S1).

L'intensità di immunoreattività del frammento di tau NH₂-derivato in sinaptosomi AD correlate all'aumento di caspasi-3 attiva (fig.2O) e alla fosforilazione patologica di α -sinucleina in Ser-129 (fig.2P), che, come scoperto, coesiste in diverse storie di malattie della famiglia dell'Alzheimer (FAD) con placche senili, in terminali sinaptici di neuroni degeneranti, contenenti tau iperfosforilata [90-93].

Infine, come mostrato in fig.2Q-R, la presenza del peptide 4KDa A β e del frammento del N-terminale 29kDa dell'enzima di clivaggio dell'APP nel sito gamma (PS1) [94] è stata anche testata in frazioni arricchite in sinapsi di controllo e di pazienti con AD, esaminando con 6E10 (residui 4-9 di A β umana) e NH₂-PS1 (residui 21-80 di PS1 umano) anticorpi di secretasi rispettivamente.

Questi dati mostrano che la distribuzione del frammento di tau troncato di NH₂ di 20-22 kDa è direttamente correlata a decadimento sinaptico associato alla neuropatologia AD.

Il profilo di solubilità del frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa

La tau diventa progressivamente non solubile durante gli stadi di AD e gli aggregati di tau filamentosi isolati da cervelli affetti dalla patologia sono segni distintivi di tauopatie, come AD [95]. Il meccanismo che sta alla base della conversione della proteina tau da uno stato solubile a uno di aggregati insolubili rimane ancora ambiguo, ma le modificazioni della

5 proteina patologiche, post-traslazionali, cioè iperfosforilazione specifica del sito e troncamento, sono considerate tra gli eventi pro-aggregazione di precipitazione [96]. Pertanto, gli autori hanno analizzato il profilo di solubilità del frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa mediante estrazione sequenziale con tamponi di stringenza crescente [56] di AD

10 umano e frazioni arricchite in sinaptosomi di controllo, seguita da Western blotting con anticorpo NH₂4268 tau (residui 26-36 di tau umana). Come mostrato in fig.3 e quantificato attraverso analisi densitometrica riportata di seguito, un'elevata quantità di doppietti di frammenti di tau troncati NH₂ è stata estratta mediante high-salt-reassembly buffer (RAB) e l'intensità di immunoreattività era superiore in casi con AD (3,15 volte) rispetto ai

15 controlli. Invece soltanto la banda risolta più lenta 20-22 kDa è stata recuperata nella frazione RIPA detergente, solubile e una porzione significativamente maggiore è stata rilevata in campioni con la malattia (5,12 volte) rispetto a campioni di controllo senza demenza. Inoltre, tale forma di tau NH₂-derivata, altamente insolubile, è stata recuperata in un tampone di SDS al 2% soltanto in AD (4,05 volte), ma era completamente assente nella

20 frazione di controllo.

Questi dati mostrano che la banda migrante rapidamente 20-22 kDa della doppietta di tau NH₂ presenta un profilo di solubilità diverso paragonato al frammento più grande, in quanto il primo è anche estratto con tamponi di stringenza superiore, facendo pensare che sia possibile una multimerizzazione/aggregazione in NFT con la progressione della

25 patologia AD.

Il frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa è localizzato in mitocondri sinaptici con AD

I terminali sinaptici di cellule polarizzate, come neuroni differenziati, sono riempiti di mitocondri necessari a supportare la richiesta di energia locale [97-99] e la carenza o la compromissione di tali organelli può causare la disfunzione sinaptica in modelli animali e

30 cellulari di AD [100,101]. Alla luce di queste considerazioni, gli autori hanno effettuato diversi studi biochimici e morfologici in tessuti ippocampali cerebrali con AD e di

controllo per valutare se il frammento di tau NH₂ 20-22 kDa che gli autori hanno rilevato in sinapsi umane era anche presente nei mitocondri.

A tale scopo, gli autori hanno eseguito innanzitutto la separazione biochimica di frazioni proteiche citosoliche e mitocondriali isolate da ippocampo cerebrale affetto da AD e di controllo, non affetto da demenza, seguita da un'analisi immunoblotting. Come mostrato in fig.4A, la banda superiore della doppietta troncata NH₂ era perlopiù recuperata nella frazione citosolica, mentre la banda migrante velocemente di 20-22 kDa è stata estratta in gran parte nella frazione mitocondriale e, aspetto importante, a un livello superiore in campioni con AD rispetto ai campioni di controllo. Va notato anche il fatto che in campioni con AD la riduzione dell'immunoreattività della banda migrante più lentamente rilevata nella frazione citosolica era inversamente correlata al netto aumento del segnale di intensità della banda più veloce in mitocondri. Questi dati inducono anche a pensare che l'aumento del frammento di tau troncato di NH₂ di 20-22 kDa era quasi completamente limitato alla frazione mitocondriale sinaptica.

L'efficienza del frazionamento di omogeneizzati e la purezza della preparazione mitocondriale sono state verificate esaminando gli estratti proteici frazionati con diversi anticorpi specifici che reagiscono con marker citoplasmatici (rame/zinco-Cu/Zn-SODI) e mitocondriali (manganese-Mn-SODII, cytC, COXIV, ANT). Come mostrato, l'intensità di immunoreazione di ANT (fig.4B) e COXIV (fig.4C) - altre due proteine mitocondriali - entrambe localizzate invece nella membrana interna dell'organello - era molto più marcata in frazioni arricchite in mitocondri, mentre tracce deboli sono state rilevate nel citosolo in campioni con AD e in quelli senza demenza. Al contrario, l'intensità di immunoreazione di cyt C (fig.4D) e MnSOD-II (fig.4E) - due proteine mitocondriali solubili localizzate rispettivamente nello spazio intramembrana e nella matrice- era sorprendentemente elevata nel citosolo, probabilmente a causa della disgregazione meccanica nel corso delle procedure di purificazione dell'organello o del rilascio citosolico dei suoi fattori apoptogenici, cioè cyt C (102,103). Tuttavia gli autori escludono che il frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa troncato rilevato nella frazione mitocondriale sia a causa di un legame non specifico della proteina alla superficie della membrana esterna, in quanto Cu/ZnSOD-I (fig.4F) - una proteina presente esclusivamente nel corpo delle cellule - è stata completamente ritrovata in estratti citosolici ed era completamente assente in frazioni arricchite in mitocondri. In aggiunta, ANT (fig.4B) e COXIV (fig.4C), che sono proteine legate alla membrana confinate al compartimento interno dell'organello, non sono state

recuperate nella frazione citoplasmatica, dimostrando inoltre la purezza delle loro preparazioni mitocondriali.

L'accumulo preferenziale del frammento più basso di tau umana NH₂-troncato di 20-22 kDa in mitocondri AD era anche correlate a una compromissione del metabolismo dell'organello, come mostrato da una diminuzione marcata di COXIV (fig.4C) e cyt C, MnSOD-II (fig.4D, E) che sono noti essere deregolati in pazienti malati [104-112]. Al contrario, un aumento del livello di espressione di ANT (fig.4B) – probabilmente come conseguenza di una risposta compensatoria non funzionale da parte dei neuroni che sopravvivono a causa della perdita dei marker mitocondriali [100,113-116] – è stato contestualmente osservato. Inoltre, non sono state rilevate differenze significative in Cu/Zn-SOD-I (fig.4F) citosolico tra le frazioni di controllo age-matched e quelle con AD.

Diversi studi hanno riportato che le specie di peptidi APP e A β sono associate a mitocondri isolate sia da frazioni cerebrali che da frazioni sinaptosomiali [117-122] di umani e di topi transgenici con AD, probabilmente attraverso interazione diretta con proteine mitocondriali specifiche [105,123-125]. Pertanto gli autori hanno testato le loro preparazioni mitocondriali esaminandole con 6E10, un anticorpo che reagisce con residui 4-9 del peptide A β umana. Come mostrato in figura4G, gli autori hanno scoperto che il peptide 4kDa A β monomero e il trimero 12kDa erano presenti in biopsie AD ed erano ampiamente arricchiti in mitocondri. Al contrario, in frazioni citosoliche e mitocondriali di controlli age-matched, senza demenza, non sono state rilevate specie di peptide 4kDa A β .

In seguito, partendo dal presupposto che il frammento della tau NH₂-troncato di 20-22kDa sia preferibilmente distribuito nella(e) sinapsi umana(e), gli autori hanno testato la sua attuale localizzazione subcellulare in mitocondri arricchiti in sinapsi. Come mostrato nelle figure 4H-I-L, l'analisi immunoblot ha confermato che il livello di espressione di questo frammento di tau NH₂ troncato era significativamente aumentato in mitocondri sinaptosomi-derivati di soggetti con AD e che era negativamente correlate alla funzione fisiologica dell'organello. Il livello di espressione confrontabile di HSP70 mitocondri-specifico (fig.4M) tra frazioni di controllo e AD ha escluso la possibilità che le differenze di immunoreattività fossero causate dal carico di diverse quantità di proteina totale.

Per dissezionare ulteriormente il frammento di tau-NH₂ umana di 20-22 kDa in associazione a mitocondri, gli autori hanno eseguito studi con microscopia elettronica con anticorpo NH₂ 4268 gold-coniugato su biopsie ippocampali. Come mostrato nelle figure, la coloratura immunogold ha mostrato una marcatura sub-sinaptica preferenziale all'interno

di mitocondri AD (fig.4O), senza una distribuzione uniforme lungo la matrice e le creste. Inoltre diverse particelle immunogold-positive sono state anche localizzate sulla membrana esterna e interna, dando origine alla possibilità che l'insieme intracellulare dei frammenti di tau N-derivati D25-clivati presenti diverse localizzazioni nei mitocondri malati. La
 5 quantificazione mostrava che erano presenti circa 10 e 214 particelle rispettivamente per mitocondri ND e AD. Non è stata rilevata una marcatura rilevante in mitocondri di controllo age-matched, non affetti da demenza (fig.4N) e il modello di colorazione specifica è scomparso quando è stato omesso l'anticorpo primario (dati non mostrati). È interessante notare che sebbene l'anticorpo NH₂ 4268 utilizzato in questa procedura
 10 sperimentale era stato precedentemente pre-assorbito con proteina tau di lunghezza completa, gli autori non possono escludere che la colorazione immunogold fosse esclusivamente correlata alla frazione di tau N-troncata D25 e non anche dovuta alla sua purificazione per affinità incompleta. Ciononostante, come dimostrato precedentemente, poiché una parte consistente di frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa era fortemente
 15 rilevata nella frazione mitocondriale dopo subfrazionamento biochimico e analisi Western blotting su sinaptosomi AD (fig.4H) e non è stata rilevata contestualmente alcuna marcatura significativa in campioni non affetti da demenza con anticorpo NH₂ 4268 pre-assorbito, gold-coniugato (fig.4N), gli autori hanno affermato che la positività immunoelettronica in immagini AD fosse pressoché completamente limitata alla
 20 popolazione intracellulare di frammenti di tau umana N-derivati D-25-clivati. Considerati insieme, questi risultati dimostravano che la concentrazione sub-sinaptica del frammento di tau-NH₂ umana di 20-22 kDa è altamente arricchito in mitocondri.

**Gli estratti solubili contenenti oligomeri A β da omogeneizzati di cervelli con AD
 25 generano il frammento di tau NH₂ 20-22 kDa e compromettono la funzione mitocondriale in SY5Y umano differenziato.**

Oligomeri A β sintetici in neuroni corticali umani determinano una compromissione acuta (12-24 ore) dell'attività dell'ossidoreduttasi mitocondriale, che era accompagnata dall'ATP intracellulare e dall'attivazione delle caspasi 3 and 7 [102]. Risultati simili sono stati trovati
 30 in neuroni ippocampali primari dopo trattamento con oligomero solubile cellule-derivato di peptide A β umani utilizzato a una concentrazione ridotta (0.5nM), confrontabili con quelli rilevati nel cervello umano e in CSF [126]. In aggiunta, la neurotossicità indotta dagli

oligomeri A β può essere mediata in colture di porzioni di ippocampo organotipico di ratti, almeno in parte, attraverso l'attivazione della via di trasduzione del segnale ERK1/2, che a sua volta porta al clivaggio della tau caspasi-3 dipendente tau cleavage [74]. Alla luce di questi risultati precedenti di altri e poiché gli autori hanno rivelato in sinaptosomi di
5 soggetti con AD la presenza del frammento NH₂ di 20-22 kDa in una stretta relazione a specie di A β , gli autori studiano se gli estratti solubili di cervello umano con AD – che contengono aggregati di A β oligomerica native [57,60] – possano generare *in vitro* il frammento NH₂ di 20-22 kDa e influire sull'attività metabolica mitocondriale. Per testare questa ipotesi cellule di neuroblastomi umane di SH-SY5Y umano dbAMPC/NGF-
10 differenziato sono state incubate con 1 mg/ml di supernatanti F12-estratti di omogeneizzati di cervello con Ade di controlli non affetti da demenza per 12 h, in presenza o in assenza di 100 μ M di Z-VADfmk o 20 μ M di MDL28170, rispettivamente un inibitore di pan-caspasi o calpaina-I.

La presenza di oligomeri di A β presenti in natura nelle preparazioni è stata innanzitutto
15 verificata attraverso analisi Western blotting in condizioni (native) non denaturanti con anticorpo policlonale A11-a, che riconosce un epitopo strutturale generico comune allo stato oligomerico, indipendentemente dalla sequenza proteica primaria [127] – e con 6E10 – un anticorpo monoclonale A β non conformazione-dipendente. Antisiero pan-oligomerico A11, che reagisce soltanto con oligomeri A β maggiori di tetrameri [127], ha rivelato
20 multipli di oligomeri con masse molecolari teoricamente intorno a 50-75kDa soltanto in omogeneizzati AD solubili grezzi. Questi multimeri A β sono stati riconosciuti anche attraverso l'anticorpo anti umano-specifico 6E10 (A β umana 4-9) (fig.5A, B frecce sottili). In alternativa, specie più basse 6E10-positive (fig.5B, frecce spesse), che presentavano soltanto una debole immunoreattività con l'anticorpo A11, possono essere determinate
25 dall'esistenza di due tipi di conformazioni solubili di A β , che sono note come oligomeri prefibrillari (A11positivo) e fibrillari e sono immunologicamente diverse [128]. Tuttavia, la capacità dell'anticorpo 22C11 (aa 66-81 of APP NH₂-terminus) e dell'anticorpo 4G8 (A β 17–24) (non mostrato) di riconoscere simili bande suggerisce che non erano né prodotti di APP NH₂-terminali né frammenti di APP solubile, che è priva del mid-domain
30 dell'epitopo di A β riconosciuto attraverso tale anticorpo. Inoltre, la valutazione di oligomeri di A β in estratti di cervello solubili grezzi è stata anche eseguita in condizioni

denaturanti, attraverso SDS-PAGE e Western blotting con anticorpo 4G8 (A β 17–24) (non mostrato).

In seguito, facendo reagire estratti di cellule intere con l'anticorpo NH₂ 4268 tau, gli autori hanno rilevato un aumento significativo di una banda immunoreattiva di 20-22 kDa in
5 colture neuronali esposte per 12-14 h a estratto AD solubile. Risultati simili sono stati ritrovati dopo incubazione con 10 μ M di peptide 1-42 sintetico di A β umana (fig.5C) – che conteneva una miscela di monomeri, dimeri, trimeri/tetrameri SDS-stabili (fig. 5Bis) – e con 2,5 mM di oligomeri 1-42 sintetici di Abeta umana in riferimento denominati ADDL (non mostrati). Non è stata rilevata alcuna banda di intensità comparabile se i neuroni
10 vengono incubati con supernatanti solubili di omogeneizzati di cervello di controllo o con soltanto veicoli o inibitori (non mostrati). In accordo con la documentazione precedente degli autori [46] e come mostrato nelle figure 5C, D-E, la pre-incubazione delle colture con Z-VADfmk – e in misura meno intense con MDL28170 – riduceva significativamente la presenza del frammento di tau-NH₂ di 20-22 KDa (fig.5C-D), bloccando l'attivazione
15 della caspasi-3 (fig.5E). Si noti il fatto che dopo trattamento farmacologico, l'aumento dell'immunoreattività della banda superiore della doppietta di tau NH-2 è inversamente correlata alla riduzione del segnale con un'intensità di 20-22 kDa minore (fig.5C), facendo così pensare che l'ultimo frammento rappresenta un prodotto intermedio di processo proteolitico. In aggiunta e aspetto più importante, la diminuzione dell'immunoreattività di
20 COXIV mitocondriale, la cui riduzione nel livello di espressione è stata considerata come effettivamente correlata al declino *in vivo* delle attività enzimatiche [105, 107] ed è stata riscontrata in neuroni dopo un trattamento di 12h con estratti AD solubili (fig.5F), è ampiamente evitata grazie all'inibizione farmacologica del peptide di tau NH₂ di 20-22 KDa. Infine, come mostrato nella figura 5G, la pre-incubazione di estratti di cervello AD
25 con anticorpo A11, e in particolare con 6E10 antibody, ha ridotto significativamente l'aumento del segnale di intensità della tau-NH₂ di 20-22 KDa in un modo anticorpo-dipendente, dimostrando così che il clivaggio di tau NH₂ era almeno in parte mediato da oligomeri di peptide(i) di A β in AD. Pertanto, non è possibile escludere che l'effetto neurotossico di omogeneizzati AD solubili non sia esclusivamente correlato a oligomeri di
30 Abeta. Inoltre, poiché l'immunoreattività della tau-NH₂ di 20-22 KDa è stata indotta dall'esposizione della coltura a oligomeri sintetici, di A β 1-42 umana (fig.5C) ed è stata invece ridotta con antisiero pre-assorbito di NH₂ 4268 in una procedura sensibile a 6E10 (fig.5G), gli autori sostenevano che l'effetto biologico degli estratti solubili AD era,

almeno in parte, dovuto a peptide(i) di A β . Si sono ottenuti risultati simili anche in colture primarie di neuroni ippocampali di ratti maturi (21DIV).

Quanto scoperto dagli autori suggerisce che estratti AD solubili contenenti specie oligomeriche di A β *in vitro* può compromettere la funzione mitocondriale, verosimilmente anche attraverso la generazione di un frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa.

Il frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa è un segno distintivo comune di altre tauopatie umane, non AD e in pazienti con AD la sua quantità è correlata alla presenza di agglomerati di A β e alla gravità patologica della malattia

10 Gli autori ricercano se il frammento di tau umana NH₂ di 20-22 kDa si presenta in altre tauopatie che non presentano o presentano in misura limitata la deposizione di A β . A tale scopo, gli autori hanno confrontato la distribuzione sinaptica di questo frammento di tau NH₂-derivato in casi di AD, DLB, che è la seconda causa più frequente di demenza negli anziani, e PiD, che è un'altra tauopatia non comune che si differenzia da AD
15 prevalentemente per la composizione di isoforme di tau (isoforme 3R) e la disposizione dei filamenti [129].

Un aspetto interessante è che attraverso Western blotting di frazioni proteiche sinaptosomiali rispettivamente con anticorpi NH₂ 4268 tau e caspasi-3 clivata (fig.6A-B), gli autori hanno rilevato un livello elevato del frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa in
20 correlazione a un aumento significativo del livello di caspasi-3, in tutti i casi con patologia analizzati ma non nel gruppo di controllo. L'estesa immunoreattività NH₂ 4268 tau-positiva ritrovata in sinapsi in tauopatie esaminate era in accordo con altri due segni distintivi di patologia NFT: iperfosforilazione e aggregazione, come mostrato esaminando estratti proteici arricchiti in sinapsi con anticorpi AT8 (fig.6D) e PHF13 (fig.6E). In
25 contrasto con una stretta associazione tra iperfosforilazione e troncamento tau NH₂, l'accumulo di specie di A β 6E10-positive non era correlato al frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa, in tauopatie non-AD testate (fig-6C file 6-7). In aggiunta, soltanto agglomerazioni oligomeriche A β , cioè dimeri (8kDa) e soprattutto trimeri (14kDa), davano origine al frammento di tau NH₂-derivato in soggetti AD analizzati (fig. 6C fila 2-4-5), in
30 correlazione alla forte attivazione di caspasi-3. Quanto scoperto suggerisce che in AD la produzione di questo frammento di tau NH₂-derivato è verosimilmente caspasi-3-dipendente e mediato da multipli di peptide 4kDa A β . Infine, è ancora più interessante come, nonostante la maggioranza di campioni si raggruppava all'interno del loro gruppo a

livello clinico e patologico, un campione (fila 3), che proveniva da un paziente giovane (49 anni) affetto da AD medio/moderato, non seguisse gli altri. Il frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa e caspasi-3 attiva erano debolmente rilevati in sinaptosomi di questo giovane paziente, in quanto i loro livelli di immunoreattività erano simili al campione di controllo, senza demenza ed era presente soltanto il peptide A β monomero.

Tutti questi dati suggeriscono che la quantità del frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa è correlata alla presenza di specie di multipli di A β , con attivazione di caspasi e con la gravità patologica in cervelli AD.

10 **Interazione del frammento di tau-NH₂ di 20-22 KDa e ANT mitocondriale**

Gli autori hanno recentemente riportato che un frammento di tau NH₂-troncato di 20-22 kDa, che è verosimilmente collocato tra gli amminoacidi 26 e 230 dell'isoforma della tau di lunghezza completa maggiore, è ampiamente arricchito in mitocondri umani di sinaptosomi crioconservati di cervelli con AD e che la sua quantità in campi terminali è correlata ai cambiamenti sinaptici patologici e alla compromissione della funzione dell'organello (Amadoro et al.,2010). In anali senza cellule su mitocondri neuronali intatti, la NH₂ 26-44 sintetica, che è la metà minima attiva che mantiene l'effetto deleterio in vitro del/i frammento/i di tau umana NH₂-derivato/i più lungo, sovraespresso (Amadoro et al.,2006;2006), riduceva la biodisponibilità di ATP intracellulare, probabilmente agendo sullo scambio ADP/ATP mediato dal traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT) (Atlante et al.,2004). Al contrario, il frammento di tau NH₂1-25, che non è tossico se sovraespresso in neuroni (Amadoro et al.,2006) non ha un effetto significativo sul metabolismo mitocondriale (Atlante et al.,2004). Alla luce di quanto scoperto, gli autori hanno ricercato se esiste un'attuale interazione fisica tra ANT e frammento/i di tau NH₂-derivato/i in condizioni rilevanti a livello patofisiologico. A tale scopo, gli autori hanno innanzitutto generato un antisiero di un neo-epitopo (anticorpo della proteina NH₂ 4268 tau caspasi-clivata, denominato anticorpo CCP-NH₂ 4268 tau) che riconosce il troncamento della proteina tau umana in D25, un sito noto di clivaggio di caspasi N-terminale precedentemente identificato in modelli cellulari e animali con AD (Corsetti et al.,2008) e in cervelli umani con AD (Rohn et al.,2002).

Come mostrato nella figura 7A, un frammento di tau NH₂ intorno a 20-22kDa, ma non la proteina di lunghezza completa 55-75kDa, è stato efficacemente immunoprecipitato mediante antisiero di CCP-NH₂ 4268 tau in esperimenti su frazioni AD arricchite in

sinapsi. Non è stata rilevata alcuna banda di intensità paragonabile in controlli non affetti da demenza age-matched. Si noti anche che esaminando con tale anticorpo, che era pre-assorbito con tau di lunghezza completa, non è stata rilevata alcuna reazione incrociata significativa con proteine tau umane intatte, che sono rilevabili soltanto debolmente in estratti totali di SY5Y neuronale trattato con STS per 6h e lisati proteici sinaptosomiale AD.

In seguito, gli autori hanno analizzato se ANT serve da target mitocondriale del frammento di tau NH₂ di 20-22kDa in esemplari di tessuto cerebrale ippocampale umano di casi AD clinicamente ben documentati e confermati a livello neuropatologico. Esperimenti di co-immunoprecipitazione su frazioni arricchite in sinapsi di casi AD e ND sono stati eseguiti utilizzando l'anticorpo CCP-NH₂ 4268 tau (26-36 residui di tau NH₂ umana) come anticorpo esca, seguiti da immunoblotting con un anticorpo di rilevamento verso ANT 1 (almeno 12 aminoacidi C-terminali di ANT1 neuronale umano), ANT1: ADP/ATP traslocasi 1 [Homo sapiens] – numero di accesso NP_001142:

MGDHAWSFLK DFLAGGVAAA VSKTAVAPIE RVKLLLQVQH ASKQISAEKQ
 YKGIIDCVVR IPKEQGFLSF WRGNLANVIR YFPTQALNFA FKDKYKQLFL
 GGVDHRHKQFW RYFAGNLAGGAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVKGKAA
 QREFHGLGDC IIKIFKSDGL RGLYQGFNVSVQGIIYRAA YFGVYDTAKG
 MLPDPKNVHI FVSWMIAQSV TAVAGLVSYF FDTVRRRMMMMSGRKGADIM
 YTGTVDCWRK IAKDEGAKAF FKGAWSNVLR GMGGAFVLVL YDEIKKYV (SEQ
 ID No. 3).

Il complesso di ANT1/frammento di tau 20-22kDa NH₂ corrispondente alla banda immunoreattiva ANT1 è stato rilevato nei sinaptosomi di cervelli con AD (fig. 7C) ma non in quelli di cervelli di controllo non affetti da demenza, mentre scompariva se l'anticorpo esca NH₂ 4268 veniva sostituito con IgG preimmune (non mostrato). Il citocromo C e α -sinucleina, una proteina neuronale che si lega a tau (Jensen et al.,1999; Giasson et al., 2003) ed è presente in modo costitutivo in mitocondri di roditori ed esseri umani (Devi et al.,2008; Liu et al.,2009), non erano contestualmente calati nell'immunoprecipitato NH₂-tau (fig. 7D-E), il che dimostra la specificità dell'interazione proteina-proteina. Esperimenti di controllo hanno dimostrato che il frammento di tau NH₂ di circa 20-22kDa era efficientemente immunoprecipitato attraverso il rispettivo anticorpo (fig.7B). Risultati simili sono stati ottenuti in cellule di SH-SY5Y umano, differenziato, che vanno incontro ad apoptosis in seguito a un trattamento con staurosporina di 6 h (non mostrato).

L'analisi densitometrica dell'intensità di segnale delle bande di immunoreattività generate da tutti i risultati di co-immunoprecipitazione (AD=3;ND=1;6h estratti di proteina totale di SY5Y=3) ha rivelato che complessi di ANT1/frammento di tau 20-22kDa NH₂ di sinapsi sono aumentati di 2,5 volte in AD rispetto a ND.

5 Per completamento, poiché l'integrità cellulare e mitocondriale può iniziare a deteriorare subito dopo la morte, non consentendo interazioni non fisiologiche, gli autori confermano la specificità dell'interazione proteina-proteina mediante isolamento di una frazione mitocondriale di cervelli umani malati e age-matched, non affetti da demenza. La purezza della preparazione mitocondriale è stata confermata mediante l'arricchimento di marker di
 10 organello specifici e mediante la relativa assenza di proteine citosoliche, come precedentemente riportato. Successivamente gli autori hanno effettuato un'immunoprecipitazione reciproca con l'anticorpo topo immunocapture ANT1 (almeno 12 amminoacidi C-terminali di ANT1 neuronale umano), per testare la presenza del frammento di tau 20-22kDa NH₂. Come mostrato nella figura 7G, l'analisi IP/Western
 15 blotting *in vivo* ha inoltre corroborato alla stabile interazione tra ANT1/frammento di tau 20-22kDa NH₂. Sono state fatte osservazioni simili anche in due esperimenti indipendenti e con l'anticorpo coniglio ANT1 (amminoacidi 45-233 di ANT1 umano) (non mostrato). Esperimenti di controllo hanno dimostrato che ANT1 era efficientemente immunoprecipitato mediante il rispettivo anticorpo (fig. 7F). Considerando queste
 20 osservazioni, gli autori si focalizzano sull'interazione patologica proteina-proteina tra tau troncata NH₂ e ANT1 mitocondriale. In effetti, sebbene fosse possibile che ANT1 fosse immunoprecipitato in campioni di controllo, non è stato possibile rivelare la banda di immunoreattività del frammento di tau-NH₂ di 20-22kDa (fig.7G), il che fa pensare che l'interazione proteina-proteina richieda verosimilmente un partner addizionale (cioè
 25 APP/Aβ mitocondriale), che è presente soltanto in condizioni patologiche.

Risultati simili sono stati ottenuti in cellule di SH-SY5Y umano, differenziato, che subiscono apoptosi in seguito al trattamento con staurosporina di 6h (non mostrato).

Questi risultati indicano che l'interazione di ANT1/frammento di tau NH₂ di 20-22kDa si presenta in mitocondri sinaptici AD e *in vitro*, in modelli neuronali simili ad AD come
 30 cellule di SH-SY5Y umano, differenziato, che subiscono apoptosi in seguito al trattamento con staurosporina di 6h.

Il frammento di tau-NH₂ di 20-22 KDa è presente nel CSF di pazienti malati

È assodato che la proteina tau sia un mediatore necessario di neurotossicità A β -indotta in AD e che i livelli aumentati della proteina tau (fosforilata completamente o iperfosforilata) in CSF sono indicative della progressione dell'AD. Inoltre, il livello aumentato di forme di tau NH₂-troncata è precocemente rilevato nel fluido cerebrospinale di pazienti con AD (Johnson et al.,1997; Portelius et al.,2008) e un modello diverso di frammenti di tau NH₂ può riflettere processi neurodegenerativi specifici della malattia (Borroni et al.,2008,2009). La tau extracellulare è tossica in neuroblastomi umani e in colture primarie di neuroni corticali e ippocampali (Gomez-Ramos et al. ,2008) e l' N-terminale della tau umana è secreto in modo specifico nello spazio extracellulare e a neuroni adiacenti in situ nel modello di tauopatia (Kim et al.,2009). In aggiunta, la diffusione (Frost et al.,2009) e il trasferimento trans-sinaptico di tossicità tau-mediata (Clavaguera et al.,2009) sono anche stati descritti in cellule in coltura e in cervelli di topi transgenici. Quanto scoperto fa pensare che le forme di tau troncata, rilasciate nello spazio extracellulare come conseguenza di danno/morte neuronale o secrezione attiva, possono esercitare la loro azione tossica anche all'esterno dei neuroni.

Nella presente invenzione è stato possibile rilevare il frammento di tau NH₂ di 20-22kDa in CSF umano di casi con AD (Fig. 8). Pertanto, il metodo diagnostico della presente invenzione può usare CSF come campione biologico.

DISCUSSIONE

Mediante frazionamento biochimico e analisi morfologica, alla conoscenza degli autori, il presente studio fornisce la prima dimostrazione del fatto che una proporzione significativa di un frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa umano è preferibilmente *in vivo* collocata nei mitocondri arricchiti in sinapsi dell'ippocampo e corteccia cerebrale con AD, se si paragona a controlli age-matched, non affetti da demenza. I dati degli autori mostrano anche che la distribuzione sinaptica prominente e preferenziale di questo peptide di tau NH₂ è direttamente correlate all'entità della degenerazione neurofibrillare, alla neuropatologia amiloidea, e più importante, alla compromissione mitocondriale e alla degenerazione sinaptica in cervelli umani con AD. Infine, gli autori hanno scoperto che gli estratti AD solubili, grezzi, che sono ampiamente arricchiti in specie oligomeriche di A β , *in vitro* inducono questo clivaggio di NH₂-tau e che la sua inibizione farmacologica migliora la compromissione mitocondriale A β -dipendente in SH-SY5Y umano differenziato.

Il troncamento di tau NH-2 è legato a disfunzione sinaptica in AD

Il decadimento sinaptico, che in secondo luogo porta a neuropatia di tipo dying-back in neuroni malati, è un segno distintivo precoce nella patogenesi di AD, in quanto si presenta prima o anche in assenza di morte neuronale [9] e costituisce il miglior segno neurobiologico di una compromissione a livello mentale in vita [1,2]. Un numero crescente di lavori sperimentali suggerisce un ruolo determinante di specie oligomeriche solubili di peptide di A β nella sinaptotossicità di AD [75,130-135]. D'altra parte, recentemente si è dimostrato come modifiche della tau patologiche sono un passo obbligatorio verso i processi che portano a neurodegenerazione, in quanto, sebbene peptidi di A β possano precedere e promuovere tauopatie, la relativa tossicità è anche tau-dipendente [27,28,136].

Peptidi di tau NH₂-derivati sono precocemente rilevati nel fluido cerebrospinale di pazienti con AD [40,41] e in seguito a un danno cerebrale traumatico (TBI) o ischemia transitoria del prosencefalo [137]. Frammenti di tau generati mediante clivaggio su entrambe le estremità della proteina umana sono stati ritrovati anche all'interno di neuriti distrofiche somatiche e prossimali in cervelli umani con AD, frequentemente attorno a placche A β -immunoreattive [35-37,138] e la presenza è stata direttamente correlate all'entità della neuropatologia e al declino cognitive durante la progressione della malattia [36,139]. Il clivaggio della tau è stato identificato in topi viventi Tg4510, che esprimono in modo reversibile tau umana mutante P301L [96,140], e in altre tauopatie, come morbo di Pick (PiD), degenerazione cortico-basale (CBD), demenza a corpi di Lewy (DLB) e paralisi soprannucleare progressiva (PSP) [141].

Specie di tau troncata sono state precedentemente trovate in un modello *C. elegans* di tauopatia, che presenta disturbi nella trasmissione sinaptica colinergica [142]. Un legame diretto tra iperfosforilazione della tau e cambiamenti sinaptici è supportato da studi recenti, i quali riportano che un'immunoreattività precoce di fosfo-Ser396 tau è stata anche riscontrata in frazioni arricchite in sinapsi della corteccia frontale di biopsie AD e DLB, in associazione a fosforilazione patologica Ser129 α -sinucleina [90]. La citometria e i metodi immunoistochimici rivelano che un accumulo patologico di peptide di A β e l'iperfosforilazione della tau (AT100;12E8;AT8;PHF1;AT180;MC1) si presentano in concomitanza, all'interno di terminali sinaptici [43,44] in sezioni cerebrali di soggetti umani con AD e modelli di topi con AD Tg2576 e 3XTg. Infine, htau, una linea di topi transgenici in cui il gene della tau endogeno è sostituito dal gene umano wild-type,

sviluppa una tauopatia del prosencefalo, senza deficit sensorimotori [143], e presenta una compromissione di apprendimento età-dipendente che comprende la disfunzione sinaptica [144]. Tuttavia, da notare che nessuno di questi studi precedenti di altri si è focalizzato sulla possibile localizzazione di tali forme di tau troncata anche in campi terminali sinaptici.

È degno di nota il fatto che studi immunostochimici *in vivo* hanno precedentemente valutato la distribuzione sub-sinaptica dei frammenti di tau umana clivata D25, N-derivata affermando che l'antisiero di CCP-NH₂ tau [35] marchi fortemente NFT, filamenti del neuropilo e neuriti distrofiche in sezioni ippocampali di cervelli con AD, mentre non è stata rilevata colorazione in controlli age-matched. Un elevato grado di marcatura con lo stesso anticorpo CCP-NH₂ è stato anche riportato nel neuropilo di campi sinaptici nell'ippocampo di topi transgenici con AD [46]. Ciononostante e in modo simile al modello di espressione *in vivo* della caspasi-3 attiva [70], i dati biochimici degli autori indicavano la presenza prominente del frammento di tau NH-2 di 20-22 kDa nelle frazioni arricchite in sinapsi altamente purificate. Tuttavia, la scoperta del fatto che una frazione di frammento di tau NH₂-derivato di 20-22 kDa è rilevabile mediante analisi sub-frazionale biochimica e Western blotting di sinaptosomi indica che la concentrazione di questo frammento è altamente arricchita in compartimento sinaptico, sebbene non possa essere escluso che sia presente a un livello inferiore - non rilevabile dai protocolli degli autori - in altri compartimenti neuronali. Ciò è in accordo con il fatto che la tau è una proteina che si lega lungo il microtubolo di assoni (MAP) la cui coda a C si lega al citoscheletro mentre il dominio N-terminale si associa alla membrana plasmatica [145]. Il segnale a forte intensità che si isola con marker sinaptici specifici (cioè PSD95) trovati in estratti proteici arricchiti in sinaptosomi di cervelli umani con AD e il requisito di esposizione a lungo termine per rilevare una banda percepibile in estratti proteici totali affetti dalla patologia (fig. 1E-F; S1) rinforza ulteriormente la localizzazione preferenziale del frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa in sinapsi di pazienti con AD. Infine, gli autori escludono la possibilità che la distribuzione sinaptica del frammento di tau-NH₂ di 20-22 kDa in casi con AD fosse semplicemente un artefatto di PMI, della procedura di frazionamento cellulare oppure del tipo di patologia/demenza analizzata per diverse ragioni. Innanzitutto, non esisteva una correlazione significativa tra questi cambiamenti patologici e PMI (che era di breve durata, circa 3-4 ore). In secondo luogo, come mostrato in un caso di AD in un paziente giovane (fig. 6 fila 3), negli stadi iniziali il livello sinaptico del frammento di tau N-derivato non era

rilevabile, verosimilmente a causa di variabilità biologica intrinseca, in concomitanza con la riduzione parallela dell'attivazione locale della caspasi-3 e l'assenza di oligomeri di peptidi di A β . In terzo luogo, la correlazione positiva tra l'attivazione di caspasi, il troncamento patologico della tau e l'iperfosforilazione è presente anche in altre tauopatie

5 genetiche A β -indipendenti che colpiscono diverse regioni cerebrali. D'altra parte, è ancora più interessante notare che la diretta correlazione osservata in sinaptosomi umani con AD tra caspasi attiva/e [70], le alterazioni sinaptiche correlate alla patologia e il frammento di tau NH₂ di 20-22 kDa suggerisce fortemente che (i) la sua formazione *in vivo* è verosimilmente caspasi-mediata e che (ii) può contribuire a una disfunzione sinaptica.

10 È anche importante considerare il fatto che, sebbene la tau di lunghezza completa, non fosforilata fosse contestualmente rilevata nelle frazioni sinaptiche degli autori, il suo livello era invariato. Ciononostante, gli autori non possono escludere un possibile ruolo di tau di lunghezza completa fosforilata in modifiche sinaptiche [90] cosicché la relazione funzionale tra tau totale e tau troncata e il suo contributo alla morte in AD deve essere

15 ancora ulteriormente esaminata. Inoltre, sebbene gli autori indichino che la/le caspasi possa/possano essere la/le principale/i proteasi responsabile/i nella generazione del frammento di 20-22 kDa [46], gli autori non escludono la possibilità di un coinvolgimento di calpaina nella generazione di questo frammento (fig. 5C). D'altra parte, l'ipotesi dei relativi ruoli di caspasi e calpastatina-calpaina nella proteolisi della tau [38,45] è

20 supportata dalla presenza di una comunicazione incrociata complessa tra due sistemi proteolitici in diversi modelli di coltura neuronale [72], dopo trattamento con Abeta [61]. In aggiunta, poiché (i) neuroni contenenti caspasi-3 attiva non sono necessariamente soggetti a morte acuta [140] e (ii) caspasi-3 attiva e il frammento di tau caspasi-derivato (Asp421) collocati entrambi in cervelli con AD [36,37], gli autori suggeriscono che anche

25 se la tau NH₂-troncata non è un evento precoce, tuttavia potrebbe contribuire alla progressione della patologia di AD

L'uso di inibitori più selettivi, analisi mutazionale e/o studi spettrometria di massa possono confermare l'esatta collocazione *in vivo* del sito di troncamento mediante caspasi N-terminale della tau umana, mentre uno screening più ampio di diversi campioni affetti dalla

30 patologia può servire a chiarire meglio il momento preciso del troncamento della tau NH₂. Infine, il meccanismo mediante il quale la tau N troncata sia concentrata nelle sinapsi in condizioni patologiche rimane ancora oggetto di ulteriori ricerche.

La distribuzione mitocondriale del peptide di tau NH₂ di 20-22 kDa può inasprire la degenerazione sinaptica in AD

I terminali sinaptici sono siti con un fabbisogno energetico elevato poiché richiedono un'alimentazione continua di ATP. Al fine di sostenere una costante biodisponibilità di ATP i mitocondri sono concentrati nelle sinapsi [97] e i cambiamenti nelle funzioni dell'organello possono influire sulla plasticità sinaptica [99]. In realtà una forte evidenza indica che la disfunzione mitocondriale sinaptica ha un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'AD [98-100] e che la scarsità di mitocondri determina la disfunzione sinaptica in dendriti e assoni [146,147]. Cambiamenti mitocondriali ultrastrutturali, che sono correlati alla perdita di arborizzazione neuritica e all'alterazione patologica di spine dendritiche, sono stati descritti in cervelli con AD, in confronto con i controlli normali [148,149]. Peptide/i di A β può/possono legarsi a mitocondri in pazienti con AD e in modelli di topi transgenici con AD [105,117,118,122,123,150], alterando le relative funzioni fisiologiche [105,120,151-154]. In aggiunta diversi studi dimostrano che specie di A β sono presenti in frazioni sinaptosomiali mitocondriali in associazione a un ingrandimento dell'organello, alla deplezione di vescicole sinaptiche e alla riduzione del metabolismo del glucosio [121,155], facendo così pensare al fatto che peptidi di A β danneggiano sinapsi in neuroni con AD, probabilmente agendo sui mitocondri ivi collocati. Il presente studio mostra che (i) il frammento di tau NH₂ di 20-22kDa è localizzato nei mitocondri sinaptici con AD, in correlazione alla disfunzione dell'organello, (ii) gli estratti acquosi solubili arricchiti di oligomeri di A β di cervelli con AD generano questo peptide di tau NH₂, in una modalità sensibile agli anticorpi, e disturbano la funzione mitocondriale in neuroni umani maturi, (iii) il blocco di questo clivaggio della tau NH₂ migliora la disfunzione mitocondriale *in vitro* A β -dipendente. Considerato assieme agli altri studi menzionati, i dati degli autori suggeriscono che il metabolismo energetico dei mitocondri sinaptici possa essere compromesso da specie oligomeriche di A β attraverso meccanismi cellulari multipli, interessando anche il clivaggio di NH₂-tau *in vivo*. In aggiunta, la localizzazione sinaptica di questo frammento di tau N-derivato in altre tauopatie ereditarie, che sono caratterizzate da una deposizione limitata di A β e dalla compromissione mitocondriale [156], suggerisce che diversi stressori A β -indipendenti possono verosimilmente avere un impatto negativo sulla funzione mitocondriale locale, attraverso un meccanismo comune che interessa il clivaggio di NH₂-tau.

Per quanto riguarda il possibile impatto delle forme di tau troncata sulla funzione mitocondriale, è stato riportato che neuroni derivati da ratti transgenici che esprimevano tau umana troncata [151-391] acquisivano una patologia AD neurofibrillare *in vivo* [157] e presentavano una riduzione significativa del numero di mitocondri e la loro distribuzione alterata nei processi, che a sua volta, causava l'accumulo di ROS, sensibilizzando le colture alla morte cellulare indotta da stress ossidativo [158]. L'analisi proteomica e funzionale di cervelli di topi transgenici con tau P301L, che presentano attivazione di caspasi-3 e clivaggio della tau caspasi-mediato in piccoli frammenti intermedi [159], ha rivelato una disfunzione mitocondriale significativa, senza variazione del numero di organelli, in correlazione ad alterazioni sinaptiche [160]. Inoltre, come riportato in un recente studio [161], l'espressione inducibile di tau caspasi-troncata Asp421 in neuroni corticali determina una forte frammentazione mitocondriale, probabilmente attraverso l'attivazione di fosfatasi calcineurina calcio-dipendente, facendo pensare che il clivaggio della tau caspasi-mediato può rilasciare uno o più frammenti che *in vivo* compromettono la funzione mitocondriale durante la progressione dell'AD. In diversi neuroni associati a NFT di cervelli con AD, frammento di tau troncata Asp421, casoasi e cyt C sono stati riscontrati come strettamente correlati tra loro [39]. L'accumulo intraneuronale di ATP sintetasi α -catena, una proteina di membrana mitocondriale interna di complesso V di fosforilazione ossidativa, è stato anche rilevato in NFT tau-positivi nella degenerazione di neuroni con AD [162]. Come hanno mostrato precedentemente gli autori [49], un peptide sintetico di tau NH₂26–44, che è probabilmente incluso nel frammento di tau NH₂ 20-22 analizzato in questo lavoro ed era la metà minima attiva che manteneva l'effetto tossico marcato *in vitro* della forma più lunga NH₂-26-230 [48], comprometteva la fosforilazione ossidativa agendo sullo scambio ADP/ATP ANT-mediato. Infine, specie di peptidi di A β e la proteina tau compromettono in modo sinergico la funzione mitocondriale *in vitro* [153] e *in vivo* [113,114], probabilmente agendo a un livello diverso della respirazione cellulare. Pertanto la presente invenzione, che fornisce per la prima volta un legame verosimilmente casuale tra disfunzione mitocondriale sinaptica e frammento di tau NH₂ in cervelli umani con AD, suggerisce che le alterazioni della tau associate alla malattia possono indurre la morte per mancato nutrimento delle sinapsi *in vivo* attraverso due meccanismi concomitanti: (i) diminuendo localmente il fabbisogno energetico come una conseguenza indiretta di una distribuzione mitocondriale alterata [158,163,164] e anche (ii) disturbando direttamente le funzioni fisiologiche dell'organello. A tal proposito, una nuova classe di antiossidanti,

compresi MitoQ, MitoVitE, MitoPBN, MitoPerossidasi, N-acetil-L-cisteina [165-168] che attraversa la barriera emato-encefalica (BBB) e in modo specifico è diretta verso i mitocondri, rappresenta un approccio promettente per la terapia dell'AD. In effetti, Dimebon, un farmaco che stabilizza i mitocondri, è in grado di migliorare la performance cognitiva in pazienti con AD per almeno 12-18 mesi [169].

Infine, poiché gli agenti terapeutici con target A β nelle sperimentazioni cliniche alla fase III non hanno portato a risultati promettenti [170,171], i presenti dati portano a considerare gli inibitori del clivaggio della tau NH-2 *in vivo* come una strategia alternativa nella ricerca di farmaci per la terapia dell'AD.

10

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Terry RD, et al. (1991) *Ann. Neurol* **30**, 572-80.
- [2] DeKosky ST, Scheff SW (1990) *Ann Neurol* **27**, 457-64.
- [3] Masliah E, et al. (2001) *Neurology* **56**, 127-9.
- 15 [4] Masliah E, Crews L, Hansen L (2006) *J Alzheimers Dis* **9**, 91-9. Review.
- [5] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006a) *Neurobiol Aging* **27**, 1372-84.
- [6] Scheff SW, Price DA (2006b) *J Alzheimers Dis* **9**, 101-15. Review.
- [7] Terry RD (2000) *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 1118-9.
- [8] Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789-91.
- 20 [9] Coleman PD, Yao PJ (2003) *Neurobiol Aging* **24**, 1023-7. Review.
- [10] Pomponi M, Bria P, Pomponi M (2008) *J Alzheimers Dis* **13**, 39-47. Review.
- [11] Almeida CG, et al. (2005) *Neurobiol Dis* **20**, 187-98.
- [12] Lanz TA, Carter DB, Merchant KM (2003) *Neurobiol Dis* **13**, 246-53.
- [13] Jacobsen JS, et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **103**, 5161-6.
- 25 [14] Rutten BP, et al. (2005) *Am J Pathol* **167**, 161-73.
- [15] Scheff SW, Price DA (2003) *Neurobiol Aging* **24**, 1029-46. Review.
- [16] Scheff SW, et al. (2007) *Neurology* **68**, 1501-8.
- [17] Masliah E, et al. (1994) *Neurosci Lett* **174**, 67-72.
- [18] Gyls KH, et al. (2004) *Am J Pathol* **165**, 1809-17.
- 30 [19] Honer WG (2003) *Neurobiol Aging* **24**, 1047-62. Review.
- [20] Kojima N, Shirao T (2007) *Neurosci Res* **58**, 1-5. Review.
- [21] Reddy PH, et al. (2005). *J Alzheimers Dis* **7**, 103-17; discussion 173-80.
- [22] Mukaetova-Ladinska EB, et al. (2000) *Am J Pathol* **157**, 623-36.

- [23] Blanpied TA, Ehlers MD (2004) *Biol Psychiatry* **55**, 1121-7. Review.
- [24] Knobloch M, Mansuy IM (2008) *Mol Neurobiol* **37**, 73-82. Review.
- [25] Harigaya Y, Shoji M, Shirao T, Hirai S (1996) *J Neurosci Res* **43**, 87-92.
- [26] Shim KS, Lubec G (2002) *Neurosci Lett* **324**, 209-12.
- 5 [27] Rapoport M, et al., (2002) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **99**, 6364-9.
- [28] Roberson ED, et al. (2007) *Science* **316**, 750-4.
- [29] King ME, et al. (2006) *J Cell Biol* **175**, 541-6.
- [30] Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) *Science* **293**, 1491-5.
- [31] Lewis J, et al. (2001) *Science* **293**, 1487-91.
- 10 [32] Oddo S, et al., (2003) *Neurobiol Aging* **24**, 1063-70.
- [33] Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM (2004) *Neuron* **43**, 321-32.
- [34] Gouras GK, et al (2000) *Am J Pathol* **156**, 15-20.
- [35] Rohn TT, et al. (2002a) *Neurobiol Dis* **11**, 341-54.
- [36] Rissman RA, et al. (2004) *J Clin Invest* **114**, 121-30.
- 15 [37] Gamblin TC, et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci U. S.A.* **100**, 10032-7.
- [38] Park SY, Ferreira A (2005) *J Neurosci* **25**, 5365-75.
- [39] García-Sierra F, et al., (2008) *J Alzheimers Dis* **14**, 401-9. Review.
- [40] Johnson GV, et al. (1997) *J Neurochem* **68**, 430-3.
- [41] Portelius E, et al. (2008) *J Proteome Res* **7**, 2114-20.
- 20 [42] Wang YP, et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S. A.* **104**, 10252-7.
- [43] Fein JA, et al. (2008) *Am J Pathol* **172**, 1683-92.
- [44] Takahashi RH, (2008) *Neurobiol Aging* In press.
- [45] Canu N, et al. (1998) *J Neurosci* **18**, 7061-74.
- [46] Corsetti V, (2008) *Mol Cell Neurosci* **38**, 381-92.
- 25 [47] Amadoro G, et al. (2004) *Cell Death Differ* **11**, 217-30.
- [48] Amadoro G, et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **103**, 2892-7.
- [49] Atlante A, et al. (2008) *Biochim Biophys Acta* **1777**, 1289-300.
- [50] McKhann G, et al. (1984) *Neurology* **34**, 939-44.
- [51] Mirra SS, et al.(1991) *Neurology* **41**, 479-86.
- 30 [52] Wemmie JA, et al. (2002) *Neuron* **34**, 463-77
- [53] Cho KO, Hunt CA and Kennedy MB (1992). *Neuron* **9**, 929-942.
- [54] Kim YJ, et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **98**, 12784-9.
- [55] Matsuo ES, et al.(1994) *Neuron* **13**, 989-1002.

- [56] Zhukareva V, Trojanowski JQ, Lee VM (2004) *Am J Geriatr Psychiatry* **12**, 136-145.
- [57] Gong Y, et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **100**, 10417-10422.
- [58] Tokuyasu, K.T (1973) *J Cell Biol* **57**, 551-565.
- [59] Culmsee C, et al. (2002) *Neuroscience* **115**, 1089-108.
- 5 [60] DeFelice FG, et al. (2008) *Neurobiol Aging* **29**, 1334-47.
- [61] Wei Z, et al. (2008) *Neuropharmacology* **54**, 721-33.
- [62] WB Stine Jr, et al. (2003) *J Biol Chem* **278**, 11612–11622
- [63] Volontè C, Ciotti, MT, Battistini L (1994) *Cytometry* **17**, 274-276.
- [64] Grimmer T, et al. (2008) *Neurobiol Aging* **30**, 1902-9.
- 10 [65] Li Y, et al. (2008) *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**, 2169-81.
- [66] Scher AI, et al. (2007) *Neuroimage* **36**, 8-18.
- [67] Arendt T (2009) *Acta Neuropathol* **118**, 167-79.
- [68] Wyszynski M, et al. (1998) *J Neurosci* **18**, 1383-92.
- [69] Dosemeci A, et al. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 687-94.
- 15 [70] Louneva N, et al. (2008) *Am J Pathol* **173**, 1488-95.
- [71] Horowitz PM, et al. (2004) *J Neurosci* **24**, 7895-902.
- [72] Neumar RW, et al. (2003) *J Biol Chem* **278**, 14162-7.
- [73] Yuste VJ, et al. (2002) *J Neurochem* **80**, 126-39.
- [74] Chong YH, et al. (2006) *J Biol Chem* **281**, 20315-25.
- 20 [75] Lesné S, et al. (2006) *Nature* **440**, 352-7.
- [76] Minger SL, et al. (2001) *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 929-36.
- [77] Qin S, Hu XY, Xu H, Zhou JN (2004) *Acta Neuropathol* **107**, 209-15.
- [78] Perdahl E, et al. (1984) *J Neural Transm* **60**, 133-41.
- [79] Davidsson P, Blennow K (1998) *Int Psychogeriatr* **10**, 11-23.
- 25 [80] Love S, et al. (2006) *Neurobiol Aging* **27**, 797-803.
- [81] Leuba G, et al. (2008) *J Alzheimers Dis* **15**, 139-51.
- [82] Gibson PH, Tomlinson BE (1977) *J Neurol Sci* **33**, 199-206.
- [83] Heredia L, et al. (2006) *J Neurosci* **26**, 6533-42.
- [84] Maloney MT, Bamberg JR (2007) *Mol Neurobiol* **35**, 21-44.
- 30 [85] Suzuki T, Okumura-Noji K (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **216**, 582-8.
- [86] Grant SG, et al. (1992) *Science* **258**, 1903-10.
- [87] Shirazi SK, Wood JG (1993) *Neuroreport* **4**, 435-7.
- [88] Ho GJ, et al. (2005) *Neurobiol Aging* **26**, 625-35.

- [89] Luna-Muñoz J, et al. (2007) *J Alzheimers Dis* **12**, 365-75.
- [90] Muntané G, Dalfó E, Martínez A, Ferrer I (2008) *Neuroscience* **152**, 913-23.
- [91] Lippa CF, et al. (1998) *Am J Pathol* **153**, 1365-70.
- [92] Rosenberg RN (2005) *Arch Gen Psychiatry* **62**, 1186-92.
- 5 [93] Leverenz JB, et al. (2006) *Arch Neurol* **63**, 370-6.
- [94] Beher D, et al. (1999) *J Neurochem* **72**, 1564-1573.
- [95] Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) *Neuron* **8**, 159-68.
- [96] Spires-Jones TL, et al. (2009) *Trends Neurosci* **32**, 150-9. Review.
- [97] Ly CV, Verstreken P (2006) *Neuroscientist* **12**, 291-9.
- 10 [98] Parihar MS, Brewer GJ (2007) *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C8-23
- [99] Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A (2008) *Neuron* **60**, 748-66. Review.
- [100] Reddy PH, Beal MF (2008) *Trends Mol Med* **14**, 45-53.
- [101] Reddy PH (2009) *Exp Neurol* **218**, 286-92. Review.
- [102] Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006) *J Neurosci* **26**, 6011-8.
- 15 [103] Kim HS, et al. (2002) *Neuroreport* **13**, 1989-93.
- [104] Maurer I, Zierz S and Moller HJ (2000) *Neurobiol Aging* **21**, 455-462.
- [105] Devi L, et al. (2006) *J Neurosci* **26**, 9057-68.
- [106] Pérez-Gracia E, Torrejón-Escribano B, Ferrer I (2008) *Acta Neuropathol* **116**, 261-8.
- [107] Vargas T, et al. (2008) *Neurobiol Aging* In Press.
- 20 [108] Gibson GE, Sheu KF, Blass JP (1998) *J Neural Transm* **105**, 855-70. Review.
- [109] Cardoso SM, et al. (2004) *Neurobiol Aging* **25**, 105-10.
- [110] Cottrell DA, et al. (2002) *Neuropathol Appl Neurobiol* **28**, 390-6.
- [111] Marcus DL, et al. (2006) *Med Sci Monit* **12**, BR8-14.
- [112] Simonian NA, and Hyman BT (1994) *J Neuropath Exp Neurol* **53**, 508-512.
- 25 [113] Rhein V, et al. (2009a) *Cell Mol Neurobiol* **29**, 1063-71.
- [114] Rhein V, et al. (2009b) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* In Press.
- [115] Nagy Z, Esiri MM, LeGris M, Matthews PM (1999) *Acta Neuropathol* **97**, 346-54.
- [116] Reddy PH (2006) *J Neurochem* **96**, 1-13. Review.
- [117] Manczak M, et al. (2006) *Hum Mol Genet* **15**, 1437-49.
- 30 [118] Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X et al. (2005) *FASEB J* **19**, 2040-1.
- [119] Yamaguchi H, et al. (1992) *Acta Neuropathol* **85**, 15-22.
- [120] Anandatheerthavarada HK, et al. (2003) *J Cell Biol* **161**, 41-54.
- [121] Mungarro-Menchaca X, Ferrera P, Morán J, Arias C (2002) *J Neurosci Res* **68**, 89-96.

- [122] Crouch PJ, et al. (2005) *J Neurosci* **25**, 672-9.
- [123] Lustbader JW, et al. (2004) *Science* **304**, 448-52.
- [124] Du H, et al. (2008) *Nat Med* **14**, 1097-105.
- [125] Hansson Petersen CA, et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **105**, 13145-50.
- 5 [126] Yang TT, Hsu CT, Kuo YM (2009) *J Neural Transm* In press.
- [127] Kaye R, et al. (2003) *Science* **18**, 486-9.
- [128] Kaye R, et al. (2007) *Mol Neurodegener* **26**, 2:18.
- [129] Goedert, Jakes R (2005) *Biochim Biophys. Acta* **1739**, 240-50. Review.
- [130] Lacor PN, et al. (2007) *J Neurosci* **27**, 796-807.
- 10 [131] Lacor PN, et al. (2004) *J Neurosci* **24**, 10191-200.
- [132] Koffie RM, et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **106**, 4012-7.
- [133] Shankar GM, et al. (2008) *Nat Med* **14**, 837-42.
- [134] Snyder EM, et al. (2005). *Nat Neurosci* **8**, 1051-8.
- [135] Shankar GM, et al. (2007) *J Neurosci* **27**, 2866-75.
- 15 [136] Sotiropoulos I, et al. (2008) *J Neurochem* **107**, 385-97.
- [137] Siman R, et al. (2004) *Neurobiol Dis* **16**, 311-20.
- [138] Rohn TT, et al. (2001) *Am J Pathol* **158**, 189-98.
- [139] Basurto-Islas G, et al. (2008) *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 470-83.
- [140] Spires-Jones TL, et al. (2008) *J Neurosci* **28**, 862-7.
- 20 [141] Newman J, et al. (2005) *Acta Neuropathol* **110**, 135-44.
- [142] Kraemer BC, et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **100**, 9980-5.
- [143] Andorfer C, et al. (2003) *J Neurochem* **86**, 582-90.
- [144] Polydoro M, et al. (2009) *J Neurosci* **29**, 10741-9.
- [145] Brandt R, Léger J, Lee G (1995) *J Cell Biol* **131**, 1327-40.
- 25 [146] Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004) *Cell* **119**, 873-87.
- [147] Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y et al. (2005) *Neuron* **47**, 365-78.
- [148] Baloyannis SJ (2006) *J Alzheimers Dis* **9**, 119-26. Review.
- [149] Baloyannis SJ (2009) *J Neurol Sci* **15**, 153-7.
- [150] Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K (2005) *J Pharmacol Sci* **97**, 312-6.
- 30 [151] Keil U, et al. (2004) *J Biol Chem* **279**, 50310-20.
- [152] David DC, et al. (2005) *J Biol Chem* **280**, 23802-14.
- [153] Eckert A, et al. (2008a) *J Mol Med* **86**, 1255-67.
- [154] Eckert A, et al. (2008b) *Neurodegener Dis* **5**, 157-9.

- [155] Gillardon F, et al (2007) *Proteomics* **7**, 605-16.
- [156] Spillantini MG, Goedert M (1998) *Trends Neurosci* **21**, 428-33. Review.
- [157] Zilka N, et al. (2006) *FEBS Lett* **580**, 3582-8.
- [158] Cente M, et al. (2006) *Eur J Neurosci* **24**, 1085-90.
- 5 [159] Ramalho RM, et al. (2008) *Mol Med* **14**, 309-17.
- [160] David DC, et al. (2005) *J Biol Chem* **280**, 23802-14.
- [161] Quintanilla RA, et al. (2009) *J Biol Chem* **284**, 18754-66.
- [162] Sergeant N, et al. (2003) *Neuroscience* **117**, 293-303.
- [163] Thies E, Mandelkow EM (2007) *J Neurosci* **27**, 2896-907.
- 10 [164] Chee FC, et al. (2005) *Neurobiol Dis* **20**, 918-28.
- [165] Reddy PH (2006) *J Biomed Biotechnol* **3**, 31372.
- [166] Sheu SS, et al. (2006) *Biochim Biophys Acta* **1762**, 256-65. Review.
- [167] Szeto HH (2006) *A.A.P.S. J.* **8**, E521-31. Review.
- [168] Murphy MP, Smith RA (2007) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 629-56. Review.
- 15 [169] Doody RS, Gavrilova SI, Sano M, Thomas RG, Aisen PS (2008) *Lancet* **372**, 207-15.
- [170] Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009a) *Nat Rev Drug Discov* **8**, 783-93.
- [171] Brunden KR, et al. (2009b) *Exp Neurol* In Press.
- [172] Smith CJ, Anderton BH, Davis DR, Gallo JM (1995) *FEBS Lett* **375**, 243-8.
- [173] Deshpande A, et al. (2009) *J Neurosci* **29**, 4004-15.

Rivendicazioni

- 1- Metodo per la diagnosi e/o la prognosi di una tauopatia in un campione biologico ottenuto da un soggetto comprendente:
- quantificazione della quantità di un frammento di tau-NH2 di 20-22 KDa comprendente la sequenza QGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPGSETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR (SEQ ID No. 1) oppure un frammento di 20-22 kDa di esso in detto campione;
 - confronto della quantità quantificata del frammento di tau-NH2 di 20-22 KDa comprendente SEQ ID No. 1 o un frammento di 20-22 kDa di esso nel campione con una quantità di controllo adatta.
- 2- Metodo per la diagnosi e/o la prognosi di una tauopatia in un campione biologico ottenuto da un soggetto comprendente:
- rilevamento della presenza di un complesso di traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT1)/frammento di tau NH2 di 20-22kDa in ditto campione in cui il frammento di tau-NH2 di 20-22 KDa comprende la sequenza di SEQ ID No. 1 o un frammento di 20-22 kDa di esso;
 - e in cui la presenza di detto complesso è indicativa della tauopatia.
- 3- Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui la tauopatia è selezionata dal gruppo di: morbo di Alzheimer (AD), demenza a corpi di Lewy (DLB), morbo di Pick (PiD), degenerazione cortico-basale (CBD), o paralisi sopranucleare progressiva (PSP).
- 4- Metodo secondo la rivendicazione 1-3 in cui il campione biologico è selezionato dal gruppo di biopsia cerebrale o CSF.
- 5- Metodo secondo la rivendicazione 4 in cui la biopsia cerebrale è dall'ippocampo o dalla corteccia cerebrale.

6- Antagonista funzionale di un frammento di tau-NH₂ di 20-22 KDa comprendente la sequenza di SEQ ID No. 1 o un frammento di 20-22 kDa di esso oppure di un complesso di traslocatore nucleotidico dell'adenina (ANT1)/ frammento di tau NH₂ di 20-22kDa per l'utilizzo come agente di trattamento di una tauopatia.

5

7- Antagonista funzionale secondo la rivendicazione 6 selezionato dal gruppo di: un anticorpo, un frammento Fab, un derivato sintetico, una molecola antisenso.

8- Antagonista funzionale secondo la rivendicazione 6 o 7 in cui la tauopatia è selezionata dal gruppo di: morbo di Alzheimer (AD), demenza a corpi di Lewy (DLB), morbo di Pick (PiD), degenerazione cortico-basale (CBD), o paralisi sopranucleare progressiva (PSP).

10

Figure 1

1/10

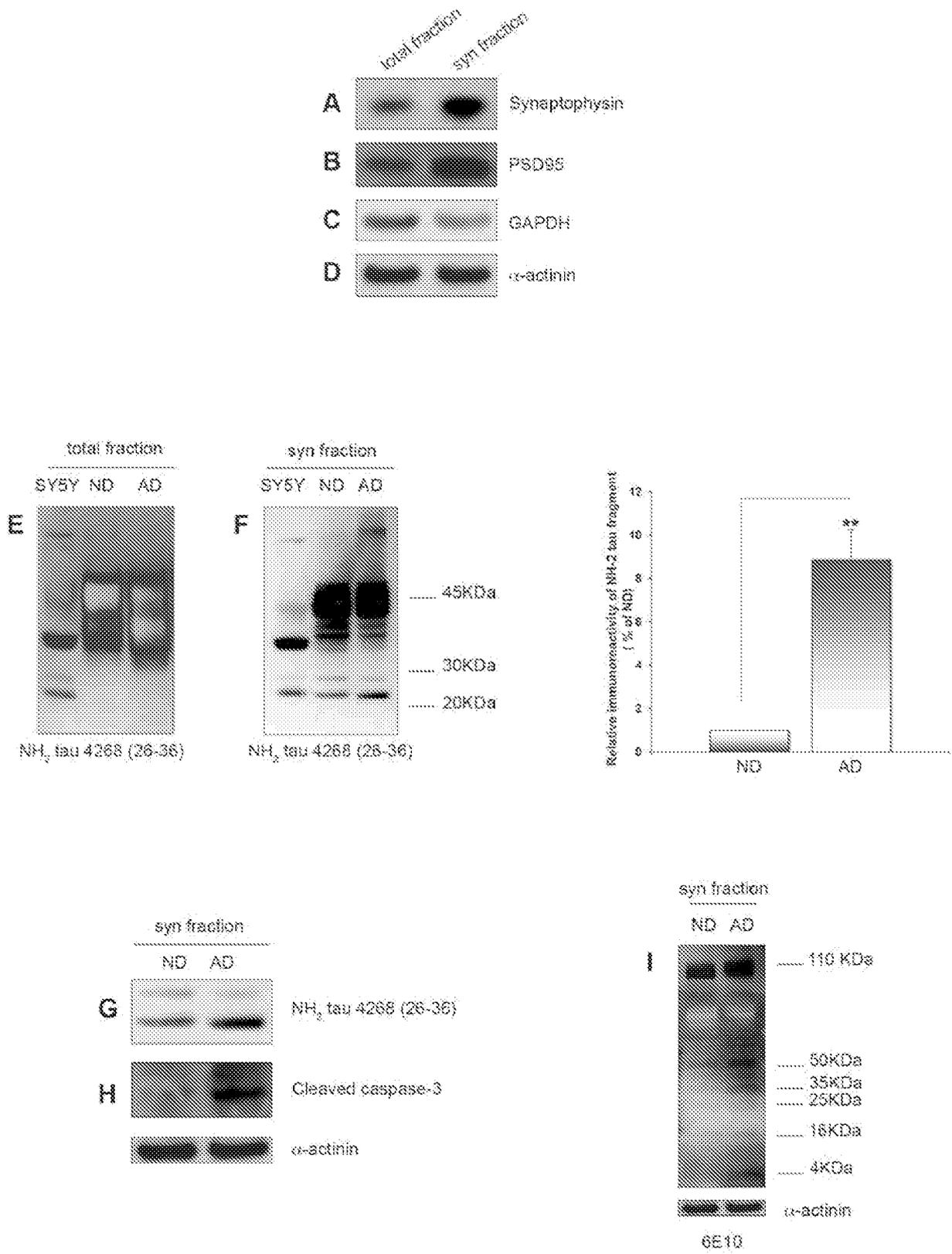


Figure S1

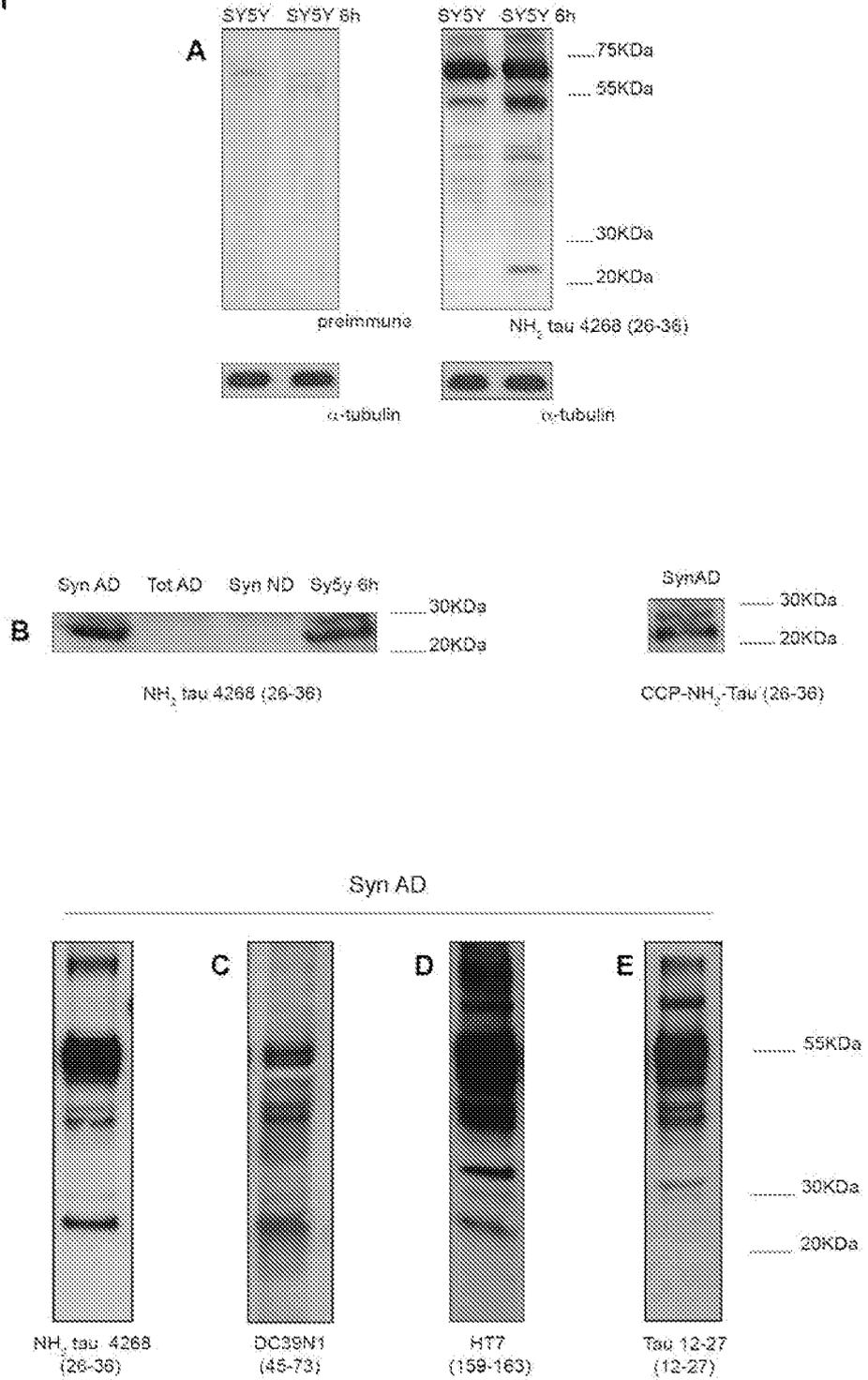
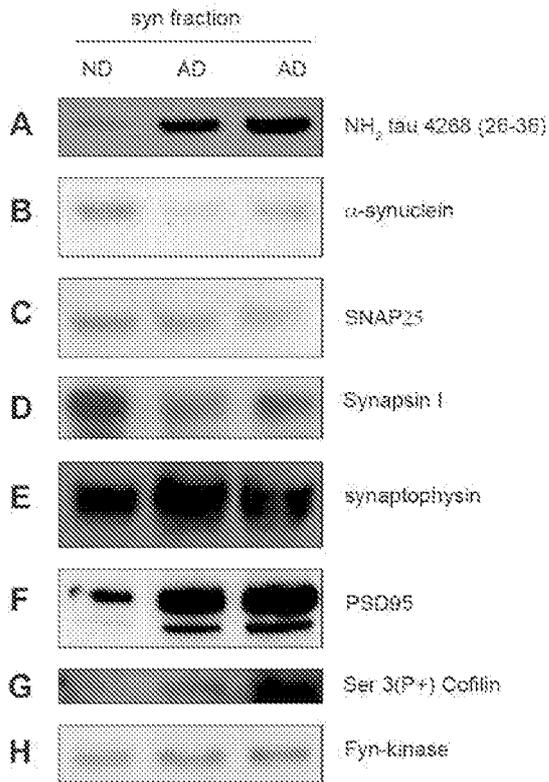


Figure 2



	ND	ADs mean (% of ctrl)
α-synuclein	1	0,68
SNAP25	1	0,78
Synapsin I	1	0,78
Synaptophysin	1	1,14
PSD95	1	2,06
Cofilin Ser 9(P+)	1	2,14
Fyn-kinase	1	1,19
Cleaved Caspase 3	1	1,36
α-synuclein P Ser129	1	1,24
6E10	1	25
PS1	1	1,26

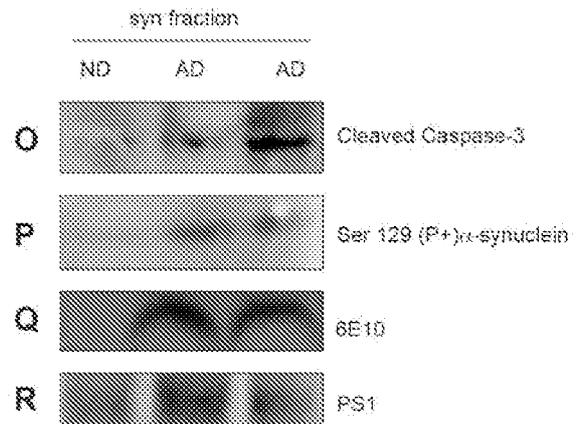
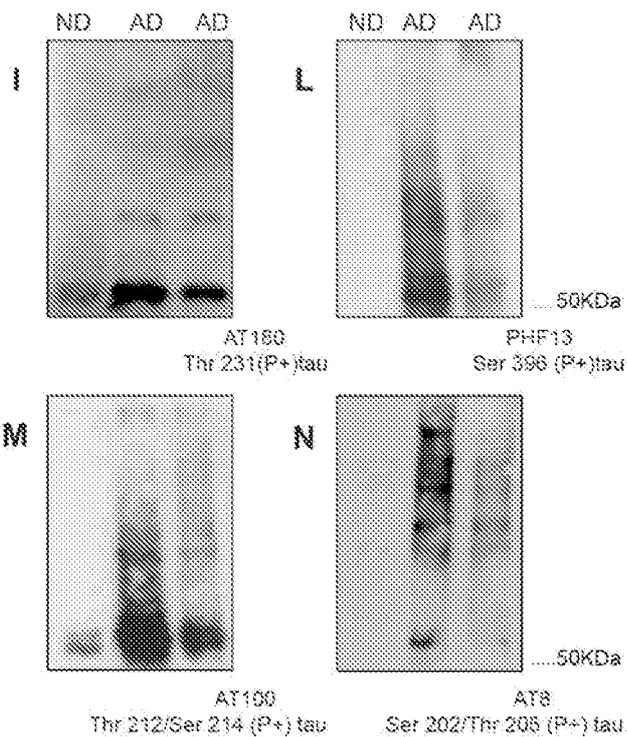


Figure 3

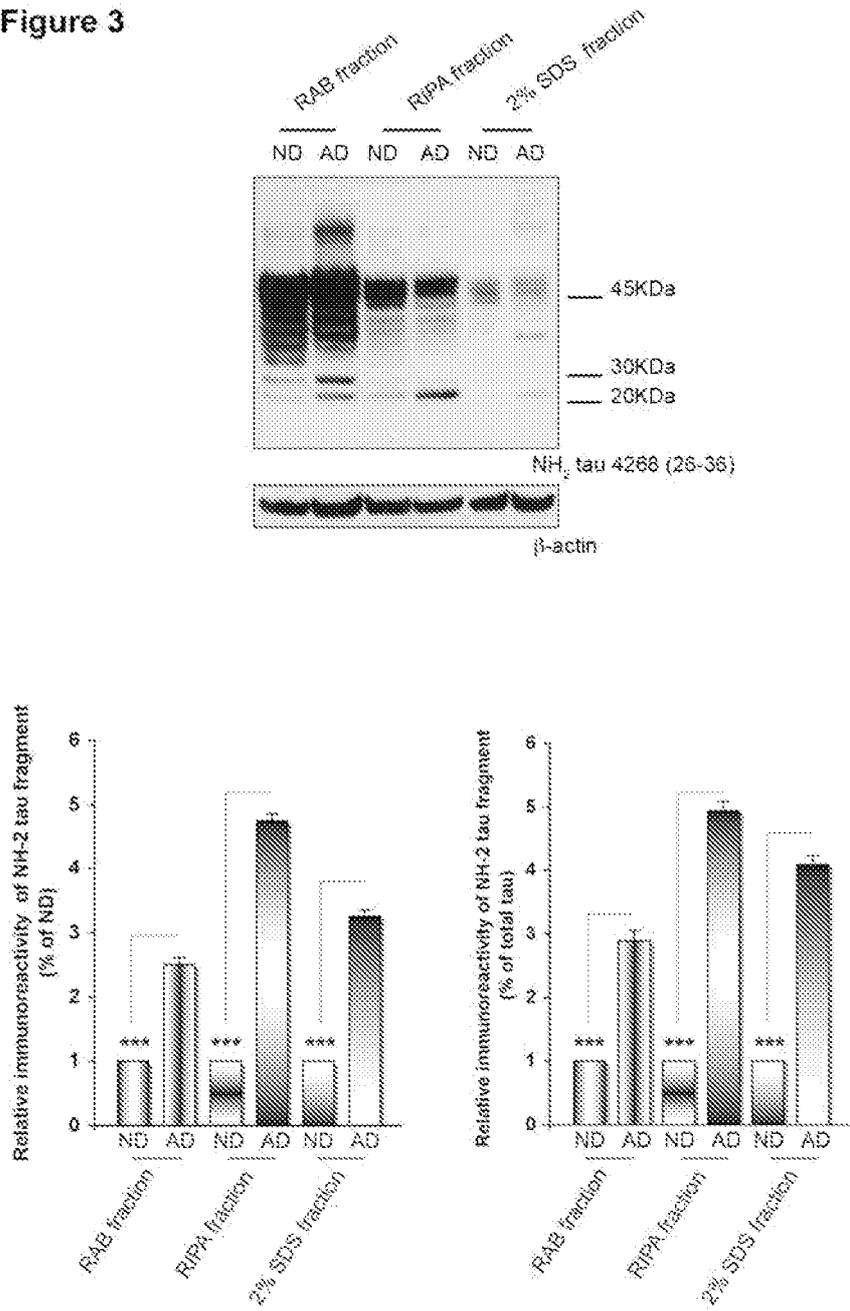


Figure 4

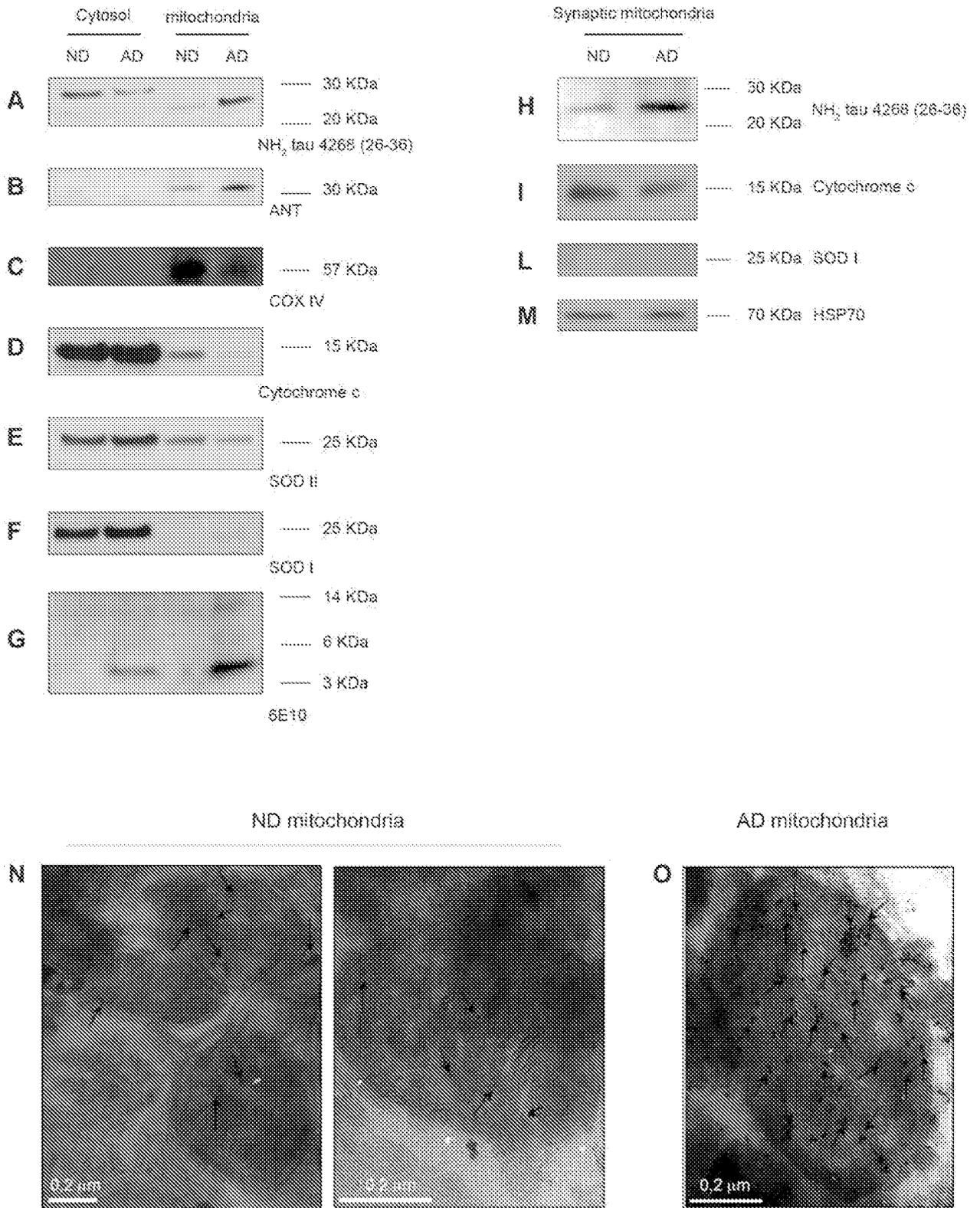


Figure 5

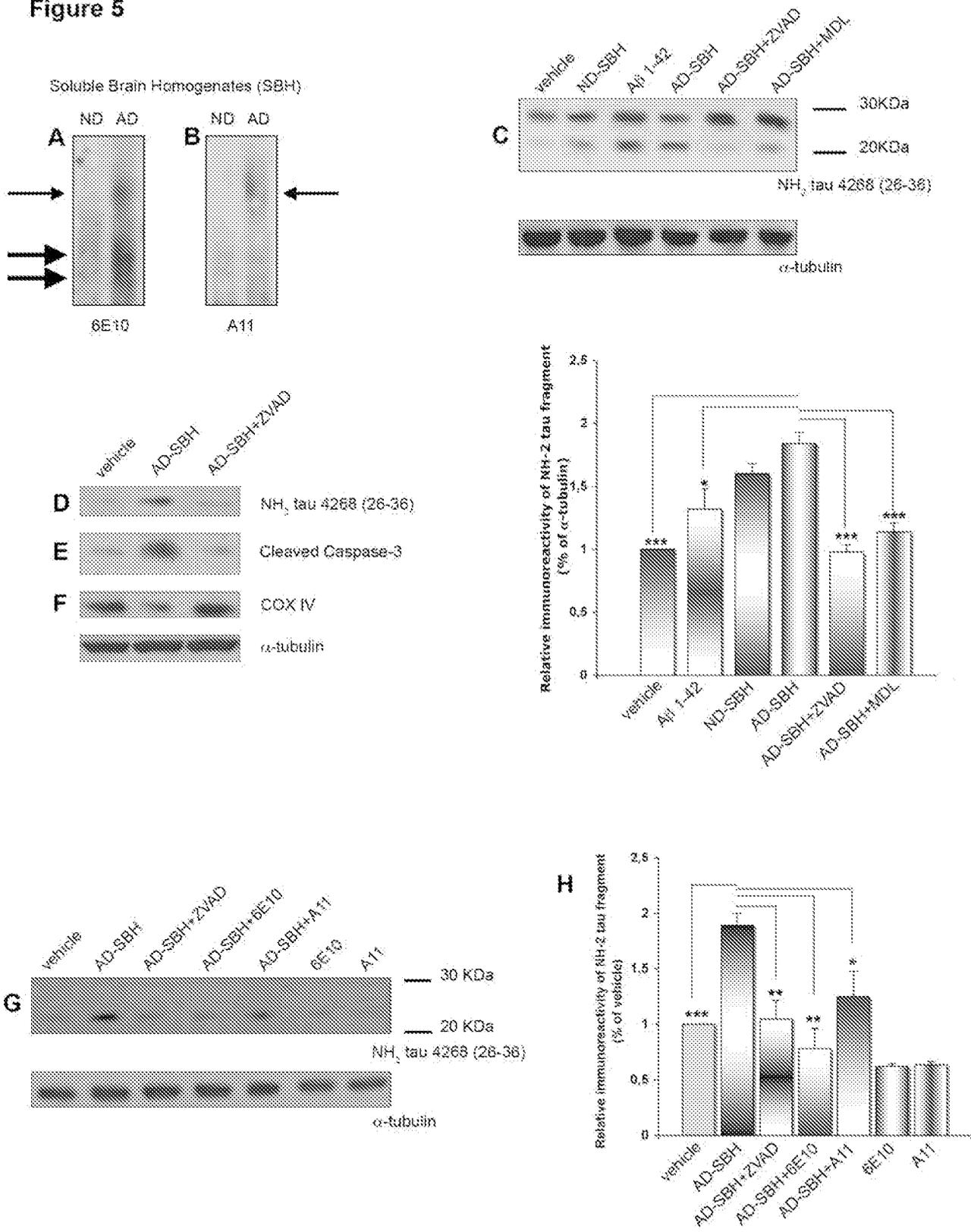


Figure 5Bis

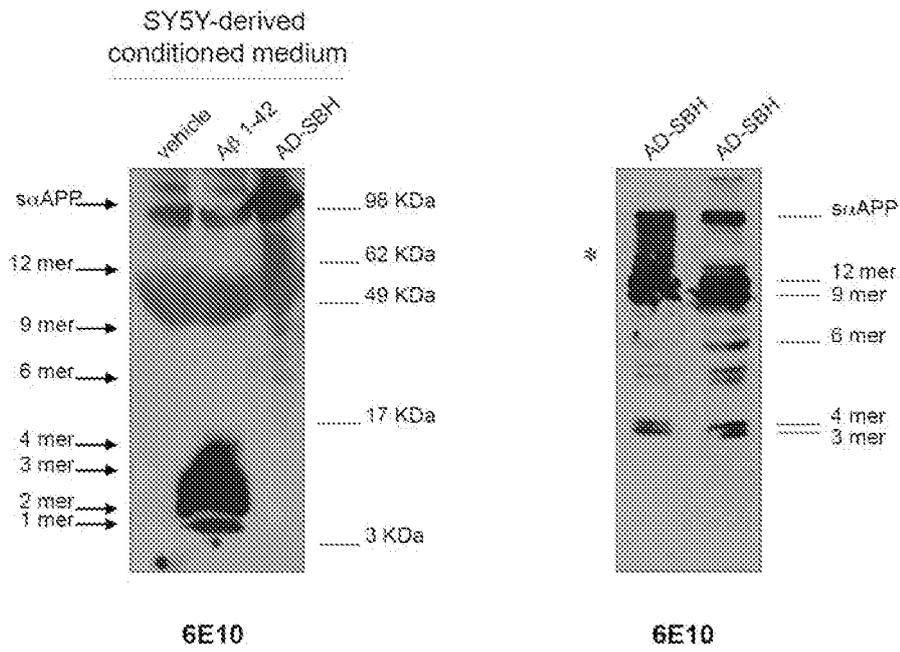


Figure 6

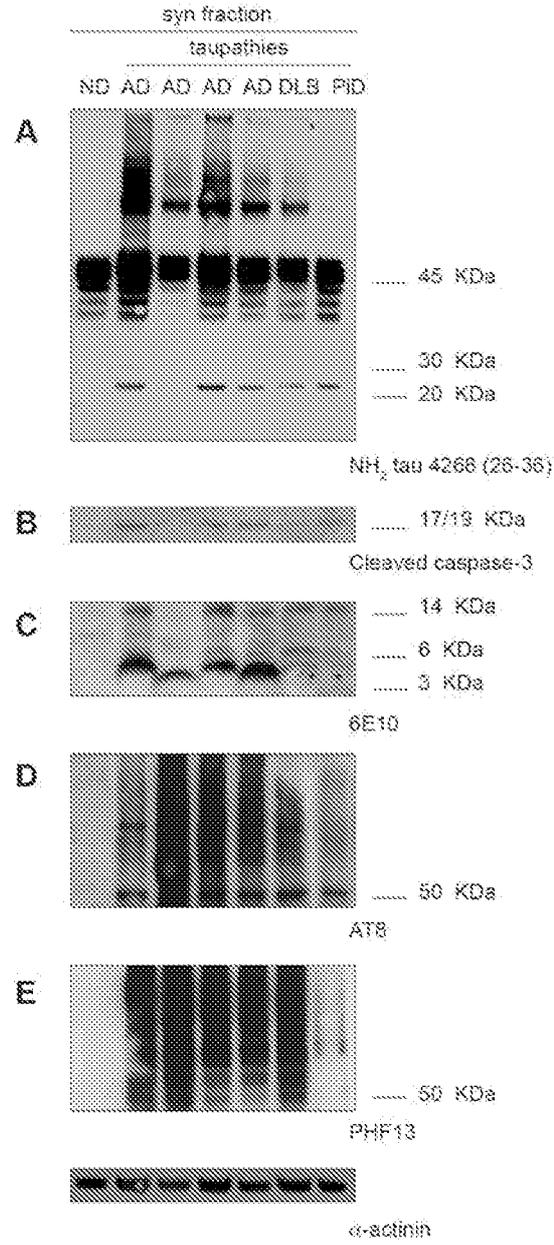


Figure 7

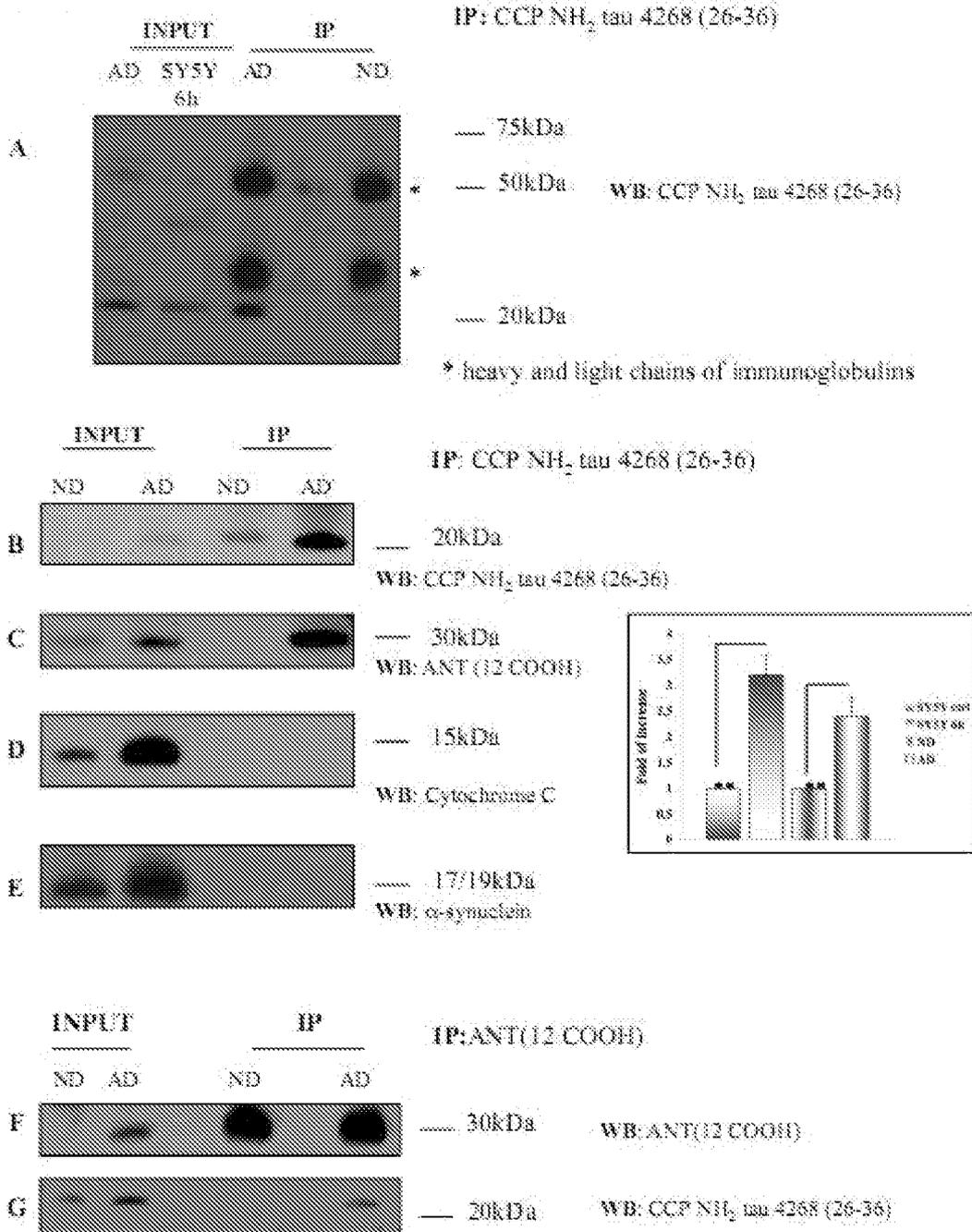


Figure 8

