

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA FACOLTA' DI MEDICINA E
CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN GERONTOLOGIA, FISIOPATOLOGIA
DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE E MEDICINA ANTI-AGING
CICLO XXXI



COLUMBIA UNIVERSITY MEDICAL CENTER, NEW YORK



**Synaptic and Memory Dysfunction Induced by Tau Oligomers
is Rescued by Up-regulation of the Nitric Oxide Cascade.**

Tesi di dottorato del candidato:

Acquarone Erica

Matricola s3136564

Coordinatore del corso di dottorato XXXI ciclo: Marcello Bagnasco

Coordinatore interno ed esterno: Odetti Patrizio e Arancio Ottavio

Tutor: Monacelli Fiammetta

Indice

Capitolo 1.....	5
1.1 Alzheimer disease	5
1.1.1 Epidemiologia.....	6
1.1.2 Introduzione.....	7
1.1.3 Patologia.....	8
1.1.4 Istopatologia.....	10
1.1.5 Modelli animali.....	13
1.1.6 Disfunzione sinaptica	18
1.1.7 Genetica della malattia	20
1.1.8 Terapie farmacologiche correnti.....	22
1.1.9 Terapie non farmacologiche	23
1.2 Amiloide-β: ruolo fisiologico?	26
1.2.1. APP Trafficking and Processing	26
1.2.2. Funzioni fisiologiche di APP.....	33
1.2.3. Ruoli di APP sull'adesione cellulare, neuritogenesi e plasticità sinaptica	34
1.2.4. Regolazione dei pathway intracellulare mediante APP.....	36
1.3 La proteina tau	37
1.3.1 Genetica molecolare, espressione e struttura di tau	37
1.3.2 Funzioni biologiche di tau	38
1.3.3 Aggregazione di Tau nell'AD	40
1.3.4 Oligomeri di tau e propagazione della patologia tau in AD.....	41
Capitolo 2.....	43
2.1 Abstract	43
2.2 Introduzione	44
2.2.1 La biologia della memoria: il ruolo di CREB e dei nucleotidi ciclici	45
2.2.2 Regolazione dell'attività trascrizionale di CREB nei neuroni e suoi coattivatori	59
2.2.3 Funzione di CREB nell'apprendimento e nella memoria	63
2.2.4 Creb e Alzheimer's disease	65
2.3 Metodi.....	67
2.3.1 Animali	67
2.3.2 Preparazione di tau ricombinante	67
2.3.3 Western Blotting della proteina CREB su cervello di topo	68
2.3.4 Misurazione del cGMP nell'ippocampo del topo.	68
2.3.5 Preparazione dei farmaci utilizzati	69
2.3.6 Registrazione tramite elettrofisiologia	69
2.3.7 Chirurgia stereotassica e metodo di infusione.....	70
2.3.8 Studi comportamentali	70
2.3.10 Analisi statistica.....	73
2.4 Risultati e figure	74
2.4.1 oTau ha effetto sul meccanismo molecolare che sta alla base della formazione della memoria	74
2.4.2 L'aumento dei livelli dell'NO attraverso un donatore di NO, DEA/NO, protegge contro la compromissione dell'LTP indotta da oTau.....	77
2.4.3 La sGC è coinvolta nell'effetto benefico dell'incremento dei livelli dell'NO contro la compromissione dell' LTP indotta da oTau.....	79

2.4.4/2.4.5 L'incremento dei livelli di cGMP levels protegge la riduzione di LTP indotta da oTau.	82
2.4.6 L'attivazione di PKG contrasta la compromissione della LTP delle fettine indotta da oTau.	85
2.4.7 L'aumento dei livelli di cGMP e l'attivazione della PKG migliorano il danno della memoria indotto da oTau nei topi.....	87
2.4.8 L'inibizione di PDE5 migliora la riduzione dei livelli di pCREB e cGMP indotta da oTau dopo l'induzione della memoria.....	90
2.4.9 Effetti di oTau sul pathway dell'NO.	94
Figura Supplementare: L'incremento dei livelli di cGMP protegge contro il blocco dell'incremento della fosforilazione di CREB associate alla stimolazione tetanica.....	92
2.5 Discussione.....	95
2.6 Conclusione.....	102
<i>Bibliografia</i>	103

*Noi siamo il nostro passato ed esso
non può essere recuperato con altro sistema
se non attraverso il meccanismo della memoria.*

Henri Bergson

Capitolo 1

1.1 Alzheimer disease

Più di cento anni fa, nel 1906, un medico Tedesco di nome Alois Alzheimer presentò un caso clinico che descriveva il declino cognitivo e vari altri sintomi neuropsicologici in un paziente di 51 anni (Möller & Graeber, 1998). All'esame anatomico post-mortem del cervello, di questo e dei successivi pazienti affetti da sintomi simili, il medico tedesco osservò diverse caratteristiche istopatologiche chiave tra cui atrofia generale del cervello, degenerazione dei neuroni, "chiazze particolari" diffuse e grovigli neuronali "arrotolati" che ricordavano "bobine" (Alzheimer, Förstl, & Levy, 1991).

Oggi, la malattia che porta il nome di quel dottore è il tipo più comune di demenza in tutto il mondo, colpendo oltre 35 milioni di persone.

Anche se innumerevoli gruppi di ricerca negli ultimi decenni hanno chiarito molti dei meccanismi patologici coinvolti nella malattia di Alzheimer (AD), c'è ancora molto da capire e da rispondere ad alcune domande fondamentali come: qual è il fattore scatenante della malattia, quali meccanismi sono qualitativamente diversi dal normale invecchiamento, e soprattutto il processo della malattia può essere fermato o invertito?

Sfortunatamente, le risposte rimangono poco chiare, e non ci sono attualmente farmaci efficaci per alterare la progressione dell'AD.

Lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche modificanti la malattia, in grado di rallentare o addirittura di invertire il declino cognitivo dell'AD, rimane una delle principali priorità della ricerca medica per l'immediato futuro.

Tuttavia, per portare a termine questo compito, dobbiamo acquisire una migliore comprensione della fisiologia e della patofisiologia delle molecole e dei meccanismi coinvolti.

1.1.1 Epidemiologia

La demenza è il termine generale che si riferisce al declino cognitivo del soggetto, talmente grave da interferire con le normali attività quotidiane. A livello mondiale, 47 milioni di persone vivono con demenza, più dell'intera popolazione della Spagna.

Si prevede che questo numero aumenterà a più di 131 milioni entro il 2050. [World Health Organization. The epidemiology and impact of dementia 2015]

La demenza ha anche un enorme impatto economico. Il costo totale stimato in tutto il mondo per la cura della demenza è di 818 miliardi di dollari.

A oggi la stragrande maggioranza delle persone con demenza non riceve una diagnosi (solo il 40% delle persone che vivono con questa patologia ha ricevuto una diagnosi), e in alcune zone accedere a cure e a trattamenti è estremamente impegnativo. Anche quando viene diagnosticata la demenza, la cura è troppo spesso frammentata, non coordinata e non risponde ai reali bisogni delle persone che vivono con la persona affetta da demenza, i loro accompagnatori e le loro famiglie. (Alzheimer 's disease International World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia coverage, Quality and costs now and in the future).

La "demenza di Alzheimer" (AD) viene catalogata tra le demenze, essendo un deterioramento cognitivo cronico progressivo. Tra tutte le demenze quella di Alzheimer è la più comune, rappresentando, a seconda della casistica, l'80-85% di tutti i casi di demenza.

A livello epidemiologico, tranne che in rare forme genetiche familiari "*early-onset*" (cioè con esordio giovanile), il fattore maggiormente correlato all'incidenza della patologia è l'età. Molto rara sotto i 65 anni, la sua incidenza aumenta progressivamente con l'aumentare dell'età, per raggiungere una diffusione significativa nella popolazione oltre gli 85 anni.

1.1.2 Introduzione

Come aveva osservato il Dr. Alzheimer, l'AD è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da

demenza progressiva. A livello istopatologico l'AD è caratterizzato da placche amiloidi e grovigli neurofibrillari (NFT) (Figura 1). Le placche contengono depositi extracellulari insolubili

di proteina beta-amiloide ($A\beta$) mentre le NFT sono strutture intracellulari composte da aggregati di tau, una proteina legante i microtubuli (Holtzman, Morris, & Goate, 2011).

Un altro segno distintivo dell' AD è la diffusa degenerazione neuronale e morte cellulare visibile come atrofia cerebrale grossolana in diverse regioni del cervello (Thompson et al., 2003). Come è comune con altre malattie neurodegenerative, esiste una vulnerabilità selettiva di alcune strutture cerebrali e tipi di cellule. In particolare, il lobo temporale mediale, incluso l'ippocampo e la corteccia entorinale, sembrano essere il sito iniziale della patologia (Jack et al., 1997).

A livello neurochimico e ultrastrutturale, numerosi studi hanno trovato che il deterioramento neuronale più grave sia a livello dell'ippocampo (Arendt, 2009). La morte cellulare, infatti è prominente in questa regione con il 60-70% dei neuroni totali persi proprio nella regione ippocampale (M. J. West, Coleman, Flood, & Troncoso, 1994).

Dal lobo temporale mediale e dal giro fusiforme, la patologia di AD si diffonde con un modello che è prevedibile per altre regioni del cervello, tra cui il cingolato posteriore, il precuneus, viene successivamente interessata la neocorteccia temporale e infine la corteccia frontale (Chételat et al., 2005)(Whitwell et al., 2007).

Mentre la maggior parte dei neuroni persi nelle regioni corticali sono glutammatergici, a livello del locus coeruleus sono danneggiati i neuroni noradrenergici e nel prosencefalo invece i neuroni colinergici che sono interessati nelle primissime fasi della malattia (Holtzman et al., 2011).

Proprio queste prime osservazioni sul deficit della neurotrasmissione colinergica hanno portato all' "ipotesi colinergica" di AD, che ha portato allo sviluppo di farmaci approvati che inibiscono l'acetilcolinesterasi, l'enzima che scompone l'acetilcolina (ACH). Tuttavia, attualmente come dimostra la limitata efficacia di questa classe di farmaci, il deficit colinergico non è più visto come una spiegazione adeguata dell'eziologia dell'AD.

A oggi non è chiaro il motivo per cui determinate regioni del cervello e tipi di cellule sono particolarmente vulnerabili nelle malattie neurodegenerative come l'AD. Tuttavia, ora è noto che i sottostanti cambiamenti patologici nelle cellule vulnerabili iniziano decenni prima dell'inizio dei sintomi (Jürgen Götz, Schonrock, Vissel, & Ittner, 2009).

1.1.3 Patologia

AD è la più comune forma di demenza. L'AD è una malattia neurodegenerativa che causa progressiva e disabilitante peggioramento nelle funzioni cognitive includendo memoria, comprensione, linguaggio attenzione, ragionamento e giudizio. E' la sesta causa di morte negli Stati Uniti. Essa può essere definita anche come malattia correlata all'età e meno dei 10% dei casi sorge prima dei 65 anni (Kumar & Tsao, 2018).

Il decorso della malattia è diviso in 4 fasi dipendenti dal progressivo del deterioramento cognitivo e funzionale:

Pre-demenza: I primi sintomi sono spesso erroneamente attribuiti all'invecchiamento o stress (Waldemar et al., 2007). I test neuropsicologici possono rivelare difficoltà cognitive lievi fino a otto anni prima che una persona soddisfi i criteri clinici per la diagnosi di AD (Bäckman, Jones, Berger, Laukka, & Small, 2004). I primi sintomi possono influenzare molte delle attività della vita quotidiana (Bäckman et al., 2004)(Arnáiz & Almkvist, 2003). Uno dei sintomi più evidenti è la difficoltà a ricordare i fatti appresi di recente e l'incapacità di acquisire nuove informazioni. Piccoli problemi d'attenzione, di pianificare azioni, di pensiero astratto, o problemi con la memoria semantica (memoria che collega la parola al suo significato) possono essere sintomatici delle prime fasi dell'Alzheimer. L'apatia, che si osserva in questa fase, è il sintomo neuropsichiatrico più persistente che permane per tutto il decorso della malattia (Landes, Sperry, Strauss, & Geldmacher, 2001). I sintomi depressivi, irritabilità e la scarsa consapevolezza delle difficoltà di memoria sono molto comuni. Questa fase preclinica della malattia è stata chiamata "mild cognitive impairment" "lieve deterioramento cognitivo" (MCI). Spesso è una fase di transizione tra l'invecchiamento normale e la demenza. MCI può presentarsi con una varietà di sintomi, e quando la perdita di memoria

è il sintomo predominante è chiamato "MCI amnesico" che è visto come una fase prodromica della malattia di Alzheimer (Grundman et al., 2004). Altro problema tipico in questa fase è il non riuscire a riconoscere determinati odori.

Fase iniziale: La diminuzione della capacità di coordinazione muscolari dei piccoli movimenti cominciano ad apparire nel paziente Alzheimer nelle fasi iniziali della malattia. Nelle persone con AD la crescente compromissione di apprendimento e di memoria porta ad una diagnosi definitiva. In una piccola percentuale, difficoltà nel linguaggio, nell'eseguire azioni, nella percezione (agnosia), o nell'esecuzione di movimenti complessi (aprassia) sono più evidenti dei problemi di memoria (Alzheimer et al., 1991). L'AD non colpisce allo stesso modo tutti i tipi di memoria. La memoria episodica, la memoria semantica e la memoria implicita sono colpiti in misura minore rispetto a nozioni imparate di recente (Carlesimo & Oscar-Berman, 1992)(Jelicic, Bonebakker, & Bonke, 1995). In questa fase sorgono anche i primi problemi a livello linguistico caratterizzati principalmente da un impoverimento nel vocabolario e una diminuzione nella scioltezza, che portano ad un depauperamento generale del linguaggio orale e scritto (Taler & Phillips, 2008). Può essere presente una certa difficoltà d'esecuzione in attività come la scrittura, il disegno o il vestirsi, coordinazione dei movimenti, ma sono comunemente inosservati.

Fase intermedia: Il progredire dell'AD ostacola l'indipendenza nei soggetti, i quali, lentamente, non sono più in grado di svolgere le attività quotidiane. Le difficoltà linguistiche diventano evidenti per via dell'afasia, che porta frequentemente a sostituire parole con altre errate nel contesto (parafasie). La lettura e la scrittura vengono lentamente abbandonate. Le sequenze motorie complesse diventano meno coordinate con il passare del tempo e aumenta il rischio di cadute. In questa fase, i problemi di memoria peggiorano, e la persona può non riconoscere i parenti stretti. La memoria a lungo termine, che in precedenza era intatta, diventa compromessa. I cambiamenti comportamentali e neuropsichiatrici diventano più evidenti. I soggetti perdono anche la consapevolezza della propria malattia e i limiti che essa comporta (anosognosia) (Wilson et al., 2011).

Fase finale: Durante le fasi finali, il paziente è completamente dipendente dal "caregiver". Il linguaggio è ridotto a semplici frasi o parole, anche singole, portando infine alla completa perdita della parola. Nonostante la perdita delle abilità linguistiche verbali, alcune persone spesso possono ancora comprendere e restituire segnali emotivi. Anche se l'aggressività può ancora essere presente, l'apatia e la stanchezza sono i sintomi più comuni. Per il malato di Alzheimer in questo stadio anche i compiti più semplici da eseguire in modo indipendente sono impossibili; la massa muscolare e la mobilità si deteriorano al punto in cui da costringere il paziente a letto e essere del tutto incapace di nutrirsi.

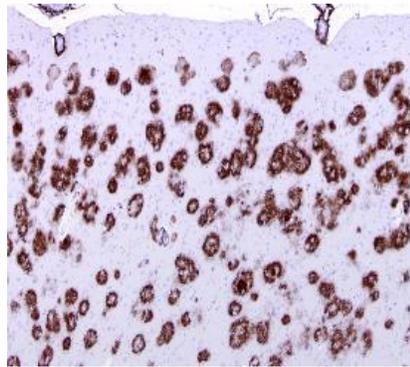
1.1.4 Istopatologia

L'AD è caratterizzata da due processi principali: la deposizione extracellulare di beta-amiloide-A β e l'accumulo intracellulare di proteina tau. Entrambi questi composti sono insolubili. A β è il componente principale delle placche senili e la proteina tau è la componente dei grovigli neurofibrillari. La deposizione di A β è specifica per l'AD e si ritiene che sia primaria.

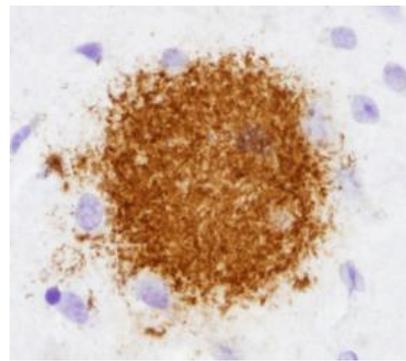
Ci sono due principali lesioni in AD, placche senili (SP) (chiamate anche placche di Alzheimer) e i grovigli neurofibrillari (NFT). Gli SP sono lesioni sferiche nella corteccia cerebrale, che misurano fino a 100 micron. Esistono 2 tipi di SP: placche A β diffuse (A β P) e placche neuritiche (NP). Gli A β P sono depositi sferici di A β extracellulare. Le NP sono A β P contenenti processi neuronali degenerativi con filamenti elicoidali tau accoppiati. Le NP contengono anche astrociti reattivi e microglia. L'A β nelle NP frequentemente forma un nucleo centrale o piccoli frammenti, ha una struttura fibrillare fine ed è Congo Red positivo e birifrangente, simile ad altri depositi amiloidei. Alcune volte sono presenti in gran numero nelle persone anziane, non dementi e non sono associati alla demenza. Un Consorzio per stabilire un registro per la malattia di Alzheimer (CERAD) ha sviluppato un sistema di punteggio della placca neuritica, che classifica la densità delle placche neuritiche identificate dalla colorazione di

Bielschowski (macchie d'argento) nella neocorteccia. Molti pazienti con AD hanno anche angiopatia amiloide cerebrale.

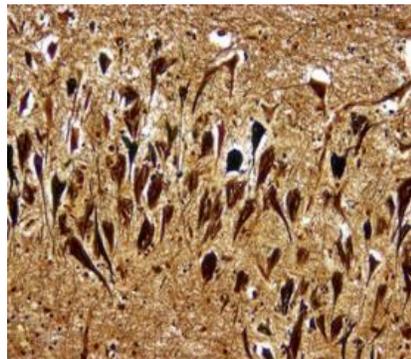
I grovigli neurofibrillari sono depositi di filamenti di tau nel corpo neuronale. Depositi simili sono presenti nei processi distrofici delle NP e nei dendriti (fili di neuropile-NT). Nell'AD avanzato, l'ippocampo spesso contiene NFT extracellulari incorporate nel neuropilo, come scheletri fossilizzati di neuroni (grovigli di fantasmi). Il meccanismo di accumulo di tau nelle NFT non è chiaro. L'opinione prevalente è che la lesione primaria in AD sia la deposizione di A β e che le NFT siano secondarie. Tuttavia, le NFT si sviluppano indipendentemente dall'AB e il declino cognitivo si correla meglio con il carico NFT piuttosto che con il numero di SP. D'altra parte, i rischi genetici e ambientali per l'AD hanno un'associazione più forte con l'amiloide. Gli NFTS si trovano in molte malattie neurodegenerative oltre all'AD, tra cui le demenze frontotemporali, l'encefalopatia traumatica cronica, la distrofia miotonica e le malattie da prioni. Questi casi indicano che le NFT possono causare neurodegenerazione indipendentemente dalla deposizione di A β . D'altra parte, gli SP si trovano solo nell'AD. La maggior parte dei casi di AD mostra una combinazione di SP e NFT, ma in alcuni casi hanno una predominanza dell'uno o dell'altro.



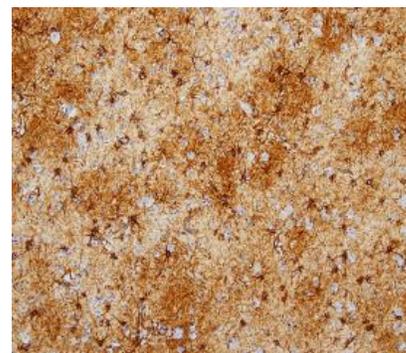
1.



2.



3.



4.

Figura 1. Beta amyloid immunostaining. Presenza di amiloide nelle placche e nei vasi sanguigni nella corteccia cerebrale

Figura 2. Placche diffuse

Figura 3. Tangles neurofibrillari

Figura 4. Gliosi tipica della malattia

L'analisi del pattern di deposizione di NFT e NT mostra che questi cambiamenti compaiono prima nella regione transentorinale del lobo temporale, lateralmente all'ippocampo, e quindi si diffondono alla corteccia entorinale, all'ippocampo e alla neocortex di associazione. Pertanto, la patologia neurofibrillare in AD si sviluppa in 3 fasi, transentorinale, limbica e isocorticale. Queste osservazioni sono alla base del sistema di stadiazione Braak e Braak dell'AD. Le fasi I e II, in questo sistema, corrispondono al coinvolgimento transentorinale; le fasi III e IV a quella limbica; e le fasi V e VI al coinvolgimento isocorticale. Le NFT nell'ippocampo e nella corteccia entorinale sono correlate con la compromissione della memoria; le NFT neocorticali sono correlate al declino cognitivo. I criteri NIA-AA del 2012 per la diagnosi neuropatologica dell'AD prendono in considerazione NFT, SP e A β P.

Gli SP sono più frequenti nella corteccia associativa. Nei casi molto gravi, le SP e le NFT appaiono anche nei nuclei profondi e nel tronco cerebrale. Non ci sono lesioni simili nella sostanza bianca.

Ogni SP rappresenta un punto focale del danno del neuropilo che include terminali assonali e dendriti di diversi neuroni e probabilmente migliaia di sinapsi. Pertanto, gli SP causano gravi disconnessioni. La distribuzione delle lesioni è correlata al quadro clinico. Il danno dell'ippocampo spiega la compromissione della memoria e il coinvolgimento della corteccia associativa si correla con la perdita di funzioni intellettuali superiori. Le SP e le NFT sono associate alla perdita di neuroni e sinapsi, atrofia cerebrale e dilatazione dei ventricoli laterali a causa della perdita di tessuto cerebrale (idrocefalo ex vacuo).

Le lesioni dell'AD possono essere meglio apprezzate in sezioni di cervello colorate con la colorazione argento di Bielschowski, la tioflavina S fluorescente e gli immunostain per A β . NFT e fili di neuropile fluorescenti si colorano di nero con la colorazione di Bielschowski. Gli immunostain di A β evidenziano i nuclei di amiloide delle SP e

rivelano anche depositi di amiloide diffusi senza interruzione del neuropilo (placche diffuse). Molti casi di AD mostrano anche depositi di amiloide a livello vascolare.

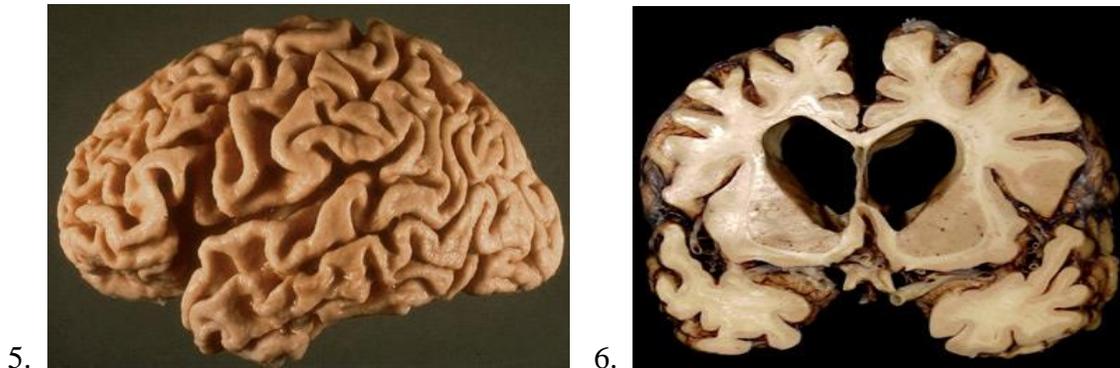


Figura 5. Atrofia corticale

Figura 6. Atrofia corticale e idrocefalo ex vacuo

1.1.5 Modelli animali

1.1.5.1 Modelli geneticamente modificati

Negli ultimi anni i modelli animali sono diventati strumenti indispensabili per la ricerca sull'Alzheimer (AD). Non esiste però un modello animale perfetto specifico per AD.

Specie di vertebrati sono stati usati per lo studio della malattia di Alzheimer tra cui il ratto (*Rattus norvegicus*), la lampreda marina (*Petromyzon marinus*) e lo zebrafish (*Danio rerio*). Tra le specie di invertebrati sono stati utilizzati come modello la *Drosophila melanogaster* e il *Caenorhabditis elegans* (Jürgen Götz et al., 2009)(Jürgen Götz, Eckert, Matamales, Ittner, & Liu, 2011).

Modelli di mammifero utilizzati per lo studio della AD includono il maiale e la pecora, (Handley et al., 2016), (Yan et al., 2018) in cui la neurodegenerazione è stata riprodotta con successo con caratteristiche simili della patologia nei suini transgenici (Jung et al., 2006).

Anche alcuni primati non umani come il Macaco (*Macaca mulatta*) sono stati adottati per studiare l'AD; però, sebbene i loro cervelli in età avanzata esibiscano amiloidosi cerebrale, la tauopatia è totalmente assente in questi animali (Van Dam & De Deyn, 2017).

Il topo (*Mus musculus*) è la specie più frequentemente usata come modello in quanto, rispetto ad altre specie animali, è ideale per la facilità di riproduzione e manipolazione genetica, nonché il costo di allevamento è relativamente basso.

Per studiare l'AD nei roditori sono stati usati approcci genetici e non genetici singolarmente o in combinazione.

I modelli transgenici dell'AD sono modelli genetici ottenuti dall'integrazione casuale di varianti geniche che codificano per proteine implicate nella patologia di AD. Questo metodo si basa sull'iniezione di costrutti di espressione in zigoti donatori e la selezione di topi che presentano il fenotipo desiderato (figura 7). Considerando che i primi modelli di topo erano stati pensati sull'espressione di proteine rilevanti nei neuroni per l'AD, nel quale il costrutto veniva espresso in cellule specifiche tramite sistemi inducibili, questi animali sono sempre più impiegati per comprendere alcuni aspetti della vulnerabilità regionale (ippocampo o cortex) e la diffusione della patologia di AD. Tale costrutto può essere ottenuto introducendo il gene di interesse sotto il controllo di specifici promotori e elementi regolatori.

Nel corso di più di due decenni sono stati generati diversi modelli di roditori che sono alla base, oggi, dello studio della malattia. Questi modelli hanno reso possibile ipotesi sull'eziologia e sulla progressione della malattia, soffermandosi su quelli che sono i pathways coinvolti e cercando di validare nuove strategie terapeutiche a sostegno del malato e fornendo anche una guida per la progettazione di studi clinici sull'uomo (Jürgen Götz, Bodea, & Goedert, 2018).

Negli ultimi anni i ricercatori hanno impiegato nella loro ricerca i ratti le cui sequenze di proteine rilevanti per la malattia di Alzheimer (AD) sono simili a quelle dei topi e degli umani. Sebbene usati meno frequentemente rispetto ai topi, i ratti presentano numerosi vantaggi per lo studio delle malattie umane come ad esempio la dimensione relativamente grande del cervello che rende molto più facile la chirurgia cerebrale. Anche i ratti sono molto facili da gestire e, a differenza del topo, sono meno stressati dal contatto umano; infatti, durante i test d'apprendimento, l'attività del topo è fortemente influenzata dal contatto dell'animale alle pareti (ad esempio della piscina). Il ratto, non essendo suscettibile al contatto umano, è più concentrato sull'esercizio e sullo sviluppo di una vera e propria strategia di apprendimento spaziale. (Klein, Sacrey, Whishaw, & Dunnett,

2012)(Whishaw, Metz, Kolb, & Pellis, 2001) I ratti, tuttavia, sono meno preferiti ai topi per la generazione di animali transgenici, principalmente per ragioni tecniche, in quanto i pronuclei dei loro embrioni sono meno visibili e le loro membrane pronucleari sono più flessibili rispetto a quelli dei topi, rendendo più difficile l'iniezione di DNA (Charreau, Tesson, Soullillou, Pourcel, & Anegon, 1996).

I primi modelli di ratti transgenici sono stati generati nel 2004. I ricercatori in questo modello di ratto hanno espresso l'APP umana con una mutazione Swedish (K670N/M671L), una mutazione Indiana (V717F) e PSEN1 umano con una mutazione Finnish M146L. (Echeverria et al., 2004) Questi modelli iniziali presentavano un accumulo citoplasmatico di amiloide- β ($A\beta$) nell'ippocampo e nella corteccia e hanno rivelato che l' $A\beta$ intracellulare, in assenza di placche, induce la regolazione extracellulare del segnale di attivazione della chinasi 2 (ERK2), induce fosforilazione della tau e deficit di apprendimento. (Echeverria et al., 2004).

Un'altra linea di ratto, il PSAPP esprime hAPP695 (che ha due differenti mutazioni (K670N/M671L e V717I) insieme a PSEN1 e sono caratterizzati da deposito di $A\beta$ intorno ai 7 mesi di età. Il modello di ratto McGill-R-Thy1-APP esprime hAPP751 con due differenti mutazioni ed è caratterizzato da inclusioni intracellulari di $A\beta$ e nel quale sono evidenziate placche già in fase postnatale a 7 giorni e presenza di $A\beta$ intorno ai 6-9 mesi di età (Leon et al., 2010). Un fenotipo 'più completo' è stato ottenuto nei ratti TgF344-AD che co-esprimono i transgeni di APP^{swe} e PS1 Δ E9 e si presentano con amiloidosi cerebrale dipendente dall'età che precede la tauopatia, la gliosi, e la perdita apoptotica dei neuroni nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo oltre che a disfunzione cognitiva (R. M. Cohen et al., 2013).

È interessante notare che la proteina tau è stata meno geneticamente modificata nei ratti. La sovraespressione di tau umano non mutato, che comprende i domini 4R, porta a iperfosforilazione di tau (Zilka et al., 2006), mentre la sovraespressione della proteina tau umana mutata (proteina tau troncata che comprende i domini 3R) ha portato ad ottenere il primo modello di ratto con progressiva degenerazione neurofibrillare corticale (Filipcik et al., 2012).

In generale, i ratti sembrano essere più resistenti a questo tipo di patologia rispetto ai topi. Uno studio che ha esaminato sia i topi APP/PS1 che i ratti iniettati con $A\beta$ 40 (meno

amiloidogenico) ha rivelato che, sebbene l'iniezione nei ratti determinava formazione di depositi di A β e perdita neuronale, questo non simulava la progressiva degenerazione tipica dei cervelli AD (D.-B. Li et al., 2006). Gli stessi costrutti vettoriali sono stati usati per generare modelli di topo che rivelano una più rapida insorgenza della patologia nei topi rispetto ai ratti (Ferretti et al., 2011).

Nonostante le opportunità offerte da questi modelli transgenici rimangono diverse limitatezze.

Il transgene umano non contiene tutte le sequenze non codificanti, rendendo impossibile studiare le interazioni genomiche umane e il ruolo delle varianti di splicing.

Rispetto alle placche A β nel cervello umano, quelle di molti modelli di roditori sono diffusi o, anche quando sono condensati, presentano meno fibrille reticolate. Un altro avvertimento, intrinseco al modo in cui gli animali transgenici sono di solito generati, è che nel sito di integrazione il numero di copie degli inserti non può essere controllato, conducendo a una vasta gamma incontrollabile di modelli di espressione a diversi livelli, una situazione che è ulteriormente complicata da potenziali artefatti di integrazione. Un'altra preoccupazione per quanto riguarda i modelli di sovraespressione è la presenza di effetti secondari (T. Saito, Matsuba, Yamazaki, Hashimoto, & Saido, 2016).

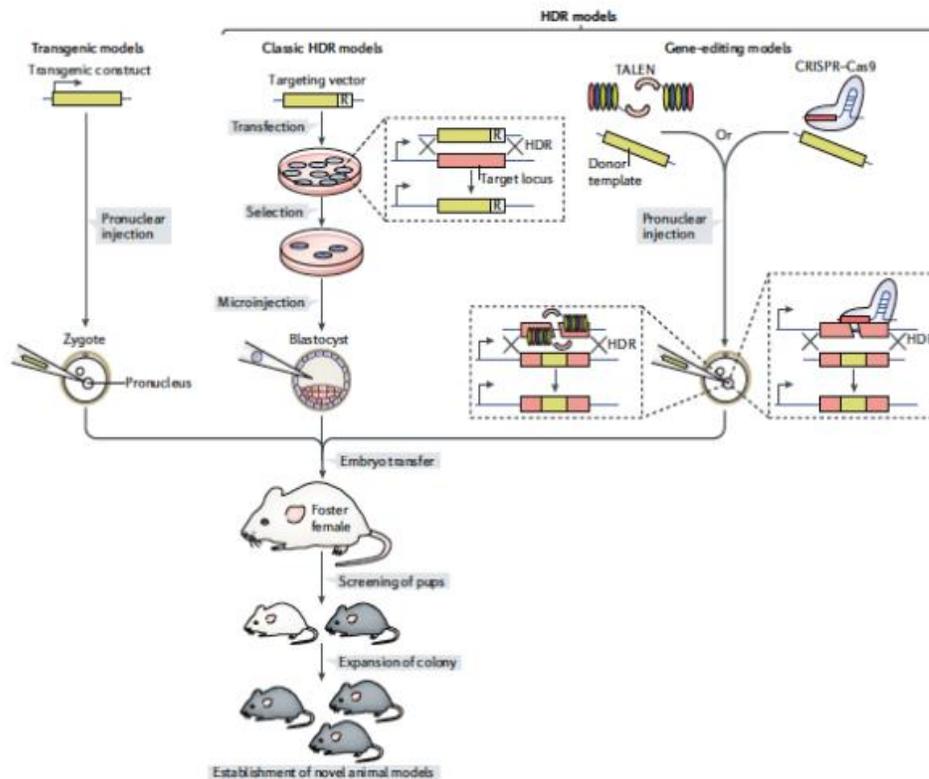


Figura 7. Modelli genetici combinati (Jürgen Götz et al., 2018).

1.1.5.2 Modelli non genetici

I modelli di AD non genetici comprendono un gruppo di modelli inducibili che ricapitolano certi aspetti presenti nella patologia di Alzheimer. I modelli intracranici basati su iniezione stereotassica sono utili per comprendere i trigger della patologia dell'AD. Ad esempio, l'iniezione di aggregati di A β sintetici nel cervello dei topi transgenici accelera la formazione di NFT, sostenendo l'ipotesi della cascata amiloidea (J Götz, Chen, van Dorpe, & Nitsch, 2001).

L'iniezione stereotassica del cervello in topi transgenici ha dimostrato la presenza di aggregati proteici inducibili a livello nucleare e lungo le proiezioni neuronali (Bolmont et al., 2007). Uno studio recente si è occupato della distribuzione della proteina tau iniettata tramite iniezione intracerebrale in topi APP KI con lisasi cerebrali arricchite per tau, rivelando un processo multistep altamente organizzato con cui le placche di A β facilitano la rapida amplificazione della proteina patologica di tau e l'organizzazione di quest'ultima in grandi aggregati (He et al., 2018).

Le iniezioni intracraniche hanno diversi vantaggi: il processo è più veloce e meno costoso di quello stabilito per la generazione di linee transgeniche, gli effetti possono essere localizzati e il ruolo di A β , ad esempio, può essere studiato in assenza della APP proteica parentale.

I principali svantaggi includono potenziali effetti confondenti dovuta all'invasività dell'iniezione intracerebrale e l'impossibilità di propagarsi nei topi come linee.

Altro prezioso aiuto sono i modelli basati sul trauma che sono stati associati a livelli elevati di A β e fosforilazione di tau. Ad esempio, è stato dimostrato che un impatto cranico provoca un aumento dei livelli di enzimi amiloidogenici come BACE1, che portano a amiloidosi (F. Yu, Zhang, & Chuang, 2012). Nei topi hTau, il lieve ma ripetitivo evento traumatico favorisce lesioni che accentuano lo sviluppo della patologia di tau, (Ojo et al., 2013) mentre lesioni da impatto corticale favoriscono l'accumulo di A β intra-assonale e l'aumento di immunoreattività del fosforo in topi Tg3 \times (Tran, LaFerla, Holtzman, & Brody, 2011).

1.1.5.3 modelli chimicamente indotti

Modelli chimicamente indotti, da soli o in combinazione con altre strategie di modellazione, sono stati usati nel ricapitolare aspetti specifici dell'AD. L'iniezione intraperitoneale di aggregati di A β è stata studiata per indurre l'amiloidosi cerebrale (Eisele et al., 2010) mentre l'iniezione intraperitoneale di aggregati della proteina tau ha portato a taupatia intracerebrale (Clavaguera et al., 2014). Sebbene i potenziali confondimenti di questi modelli includano effetti indiretti, come l'attivazione gliale, essi possono fornire indizi sull'eziologia dell'AD sporadico.

1.1.6 Disfunzione sinaptica

La malattia di Alzheimer (AD) è un disturbo della disfunzione cognitiva e di fallimento sinaptico. Nel 1975 fu ipotizzato che il concetto di fallimento sinaptico fosse strettamente connesso alla degenerazione dell'albero dendritico osservata nell'AD che si concretizzava clinicamente in una consistente perdita neuronale (Scheibel, Lindsay, Tomiyasu, & Scheibel, 1976), (Scheibel, Lindsay, Tomiyasu, & Scheibel, 1975).

Da allora, è stato confermato che la perdita di sinapsi è in effetti un importante correlato strutturale della demenza e probabilmente è alla base dei deficit cognitivi dell'AD (Terry et al., 1991). Il deterioramento sinaptico è un evento precoce che si verifica ben prima della formazione di placche amiloidee e della morte neuronale (Dennis J Selkoe, 2002).

Questa degenerazione è evidente sia a livello ultrastrutturale come morfologia anormale della colonna vertebrale e della diminuzione della densità neuronale della colonna vertebrale come pure a livello neurochimico con una netta diminuzione dei livelli di proteine sinaptiche.

Di tutte le regioni del cervello, il più soggetto a perdita sinaptica è sicuramente l'ippocampo. (Arendt, 2009). Anche allo stadio MCI, c'è già un sostanziale perdita di sinapsi che peggiora con la progressione della malattia (Terry et al., 1991). Anche nella fase lieve dell'AD, c'è una perdita di circa metà delle sinapsi nella zona CA1 dell'ippocampo (S W Scheff, Price, Schmitt, DeKosky, & Mufson, 2007), (Stephen W Scheff, Price, Schmitt, & Mufson, 2006).

Gli oligomeri solubili di A β sono stati implicati come le specie citotossiche primarie nell'AD, e in effetti, questi aggregati hanno dimostrato avere molti effetti dannosi sulla sinapsi.

Diversi studi hanno dimostrato che gli oligomeri di A β sembrano legarsi o raggrupparsi preferenzialmente alle sinapsi; uno studio, infatti riporta che il 90% del legame dell'oligomero di A β nei neuroni avviene lungo le spine dendritiche nei siti positivi per PSD-95, un marker per i compartimenti post-sinaptici (Lacor et al., 2004). A livello strutturale, si è dimostrato che gli oligomeri di A β causano cambiamenti nella colonna vertebrale a livello morfologico e nella diminuzione della densità neuronale della colonna vertebrale (Lacor et al., 2007) (Dennis J Selkoe, 2008).

Diversi recettori della neurotrasmissione sono stati implicati nel legame/interazione con A β , tra cui α 7-nAChR, GluR2, mGluR5 e NMDAR. Qualunque sia la/e via/e di segnalazione iniziale, gli effetti a valle degli oligomeri di A β sulla fisiologia sinaptica sono ben studiati. I numerosi effetti nocivi osservati in questi studi includono l'internalizzazione dei recettori del glutammato, alterato rilascio e assorbimento dei neurotrasmettitori e deficit nella plasticità sinaptica (S. Li et al., 2009). Quest'ultimo effetto è stato particolarmente ben documentato da studi che dimostrano come

l'inibizione del potenziale a lungo termine (LTP) e la facilitazione della depressione a lungo termine (LTD) siano dovute a A β (S. Li et al., 2009), (Walsh et al., 2002), (Dennis J Selkoe, 2008), (Shankar et al., 2008).

Le conseguenze della disfunzione sinaptica indotta da A β sono evidenti nell'apprendimento e nella memoria deficitari nei vari modelli animali AD sia negli organismi ai quali A β è iniettata intraerebralmente sia negli organismi murini transgenici che sovraesprimono la proteina precursore dell'amiloide (APP). In uno studio particolarmente convincente, l'immunizzazione passiva con un anticorpo A β ha rapidamente invertito i disturbi della memoria in un modello di topo transgenico APP senza incidere sul carico complessivo di A β nel cervello (Dodart et al., 2002). Questo studio sottolinea la tossicità acuta delle specie A β solubile sul funzionamento sinaptico e sul valore degli approcci terapeutici che possono prevenire tale danno.

1.1.7 Genetica della malattia

A seconda che esista una storia familiare o meno, l'AD viene classificato in AD familiare e AD sporadico (SAD). Nell'AD, i geni mutati sono la proteina precursore dell'amiloide (APP) e la presenilina (PS) (Carmona, Hardy, & Guerreiro, 2018). Per SAD che comprende più del 90% dei casi di AD, i geni più influenti comprendono il gene dell'apolipoproteina E (ApoE), il gene della clusterina, il gene del recettore del complemento 1 e i fosfolipidi che si legano al gene della proteina clatrina (PICALM) (Carrasquillo et al., 2010). Grazie allo sviluppo della ricerca genetica nell'AD, sono stati scoperti molti nuovi loci genetici nei quali sono stati riscontrati mutazioni, tra cui il gene del metabolismo del colesterolo (CH25H, ABCAL e CH24H), (Feulner et al., 2010) il gene Sterol O-acyltransferase (Soat1), il gene prostaglandin-endoperossido synthase 2 (Ptgs2) (Chesler et al., 2005) e il gene dell'enzima di conversione dell'angiotensina. Ricerche condotte negli ultimi anni hanno dimostrato che il microRNA (miRNA) è strettamente correlato alla nosogenesi dell'AD, il miRNA svolge un ruolo importante nell'AD e nell'espressione della traduzione genica (Reddy et al., 2017). Nello studio di Li et al. hanno scoperto che il gene ApoE4 appare frequentemente nei casi di pazienti con AD avanzata e che ApoE4 è il fattore di rischio della ricorrenza di AD infatti il tasso di

frequenza del gene ApoE4 è direttamente correlato alla probabilità di sviluppare AD (Hauser & Ryan, 2013).

A β è un peptide di 36/46 amminoacidi, che fa parte di una proteina più grande, la proteina precursore dell'amiloide (APP). L'APP è una proteina transmembrana, prodotta da neuroni e altre cellule cerebrali. Si trova anche nei tessuti extraneurali ed è particolarmente abbondante nelle piastrine. La sua funzione è sconosciuta. Il residuo di amiloide A β include parte del dominio transmembrana di APP ed è derivato dalla scissione di APP dagli enzimi β - e γ -secretasi. I monomeri e gli oligomeri di A β sono ulteriormente degradati da altri enzimi. La clearance difettosa di A β dalla scissione aberrante di APP e di altri meccanismi provoca il suo accumulo. I monomeri di A β polimerizzano inizialmente in oligomeri solubili e quindi in frammenti insolubili più grandi come A β 42, che precipitano come fibrille amiloidi. (Carmona et al., 2018). A β è tossico per i neuroni. Nelle preparazioni di fettine di cervello, A β provoca perdita di potenziamento a lungo termine, danneggia le sinapsi e uccide i neuroni. Inoltre, mostra neurotossicità selettiva per l'ippocampo e la corteccia entorinale mentre risparmia i neuroni cerebellari. Questo danno è mediato dai radicali liberi, che sono generati quando l'A β solubile è complessato con Zn²⁺, Cu²⁺ e Fe³⁺. Esiste un'alta correlazione tra la quantità di A β solubile e la gravità della disfunzione neurologica nell'AD.

TAU. La degenerazione neurofibrillare è caratterizzata dalla deposizione nel corpo neuronale e dai processi di polimeri insolubili di proteina tau sovra-fosforilata associata a microtubuli. I depositi di tau si aggregano come coppie di filamenti che si attorcigliano l'uno attorno all'altro (filamenti elicoidali accoppiati). Questi depositi interferiscono con le funzioni cellulari spostando gli organelli e disturbando la spaziatura dei microtubuli, compromettono il trasporto assonale influenzando così la nutrizione dei terminali degli assoni e dei dendriti. Nessuna mutazione del gene tau si verifica nell'AD. La proteina tau anormale appare per la prima volta nella corteccia entorinale, poi si diffonde nell'ippocampo e nelle fasi successive nella corteccia associativa. Recenti osservazioni in topi transgenici suggeriscono che la diffusione della patologia nelle aree anatomicamente collegate avviene per passaggio di tau anormale attraverso le sinapsi.

1.1.8 Terapie farmacologiche correnti

Tutti i farmaci attualmente approvati dalla FDA per l'AD prevedono la modulazione di neurotrasmissione. Donepezil (Aricept, Eisai, Pfizer), Galantamina (Razadyne; Ortho McNeil Janssen), Rivastigmina (Exelon; Novartis) e Tacrine (Cognex; Sciele Pharma) sono tutti inibitori di acetilcolinesterasi (AChE), un enzima che scompone l'acetilcolina. Questi farmaci sono nati dall'"ipotesi colinergica" dell'AD, che si basava sulle prime osservazioni della neurodegenerazione in particolare dei neuroni colinergici nel proencefalo basale (Davies & Maloney, 1976) (Whitehouse, Struble, Clark, & Price, 1982). Era già chiaro come l'acetilcolina fosse un importante modulatore dei processi cognitivi.

Dato che l'AD è sempre associato a diversi deficit neurochimici comprese la riduzione della colina acetiltransferasi, della captazione della colina e il rilascio di ACh, l'ipotesi colinergica è stata creata per attribuire la disfunzione cognitiva della malattia a deficit nella neurotrasmissione colinergica (Bartus, Dean, Beer, & Lippa, 1982). Questa idea ha preso piano piano piede nel mondo medico/scientifico portando alla creazione dei primi farmaci per AD, che, a oggi, rimangono l'opzione farmacologica primaria per eccellenza. Sfortunatamente, i dati provenienti da quasi due decenni di esperienza con questi farmaci indicano che l'efficacia è limitata, con solo lievi miglioramenti nella cognizione ma nessun effetto duraturo sulla progressione della malattia (Hansen, Gartlehner, Lohr, & Kaufer, 2007). Inoltre, solo il 25-50% dei pazienti AD risponde efficacemente al trattamento con questi farmaci (Giacobini, 2000); le ragioni alla base di questa variabilità clinica rimangono poco chiare, ma possono essere dovute allo stadio individuale della degenerazione colinergica. Data la mancanza di altre strategie terapeutiche, Donepezil è attualmente il farmaco più ampiamente prescritto ed è approvato per tutte le fasi della malattia.

Il secondo farmaco più ampiamente prescritto è la Memantina, che è l'unico farmaco approvato che non è un AChE inibitore. La Memantina funziona come antagonista non competitivo voltaggio-dipendente degli NMDAR, un recettore di glutammato ionotropico che è coinvolto nella plasticità sinaptica e nella memoria. Poiché vi è evidenza di ipereccitabilità anormale nel paziente, si ipotizza che la Memantina agisca diminuendo l'eccitotossicità del glutammato (Reisberg et al., 2003).

Ci sono anche prove che la Memantina si leghi preferenzialmente ai recettori NMDAR extrasinaptici, che possono avere un ruolo patologico nell'attivazione della produzione di A β (Bordji, Becerril-Ortega, Nicole, & Buisson, 2010)(Hardingham & Bading, 2010). La Memantina è attualmente approvata per fasi di AD di grado da moderato a severo. Tuttavia, come i farmaci inibitori dell'AchE, l'efficacia nel migliorare la cognizione è limitata, senza significative modificazioni negli effetti della malattia.

Data l'efficacia minima degli attuali farmaci per AD, che sono basati su neurotrasmettitori, i recenti sforzi per la scoperta di nuovi farmaci si sono concentrati sull'A β , un obiettivo che più probabilmente produrrà un trattamento atto a modificare la malattia nelle sue varie fasi. Si stanno cercando di sviluppare strategie terapeutiche che mirano alla plasticità e alla cognizione sinaptica, che sono attualmente in fase di test clinico. La maggior parte di queste strategie si concentra su vari sistemi di neurotrasmettitori, tra cui acetilcolina, monoamine, glutammato e GABA. Tuttavia, ci sono anche obiettivi più ambiziosi, ancora in fase di sviluppo, che potrebbero portare ad un miglioramento della cognizione tramite meccanismi basati su enzimi di acetilazione dei canali del calcio, della fosfodiesterasi e dell'istone (Lane, Shineman, Steele, Lee, & Fillit, 2012).

Prima della morte dei neuroni, negli stadi preclinici asintomatici, le anomalie sinaptiche sono probabilmente eventi ancora reversibili che possono essere mirati farmacologicamente. Questo sottolinea ulteriormente la necessità per una diagnosi precoce e di intervento. Infatti grazie alla ricerca, colpire i giusti target sinaptici può avere significativi effetti a valle nella prevenzione della neurodegenerazione.

Inoltre, con l'ipotesi che terapie possono modificare la malattia nelle varie fasi, i farmaci che mirano acutamente alla plasticità sinaptica sarebbero ancora necessari per il trattamento dell'AD sintomatica poiché gli effetti dei composti modificanti la malattia sulla cognizione potrebbero non essere immediati.

Una terapia combinata, in questi casi, sarebbe ideale, coinvolgendo sia l'accrescimento/mantenimento cognitivo acuto sia la modificazione cronica dei percorsi patologici.

1.1.9 Terapie non farmacologiche

1.1.9.1 Tau come bersaglio terapeutico per malattie neurodegenerative

Stabilizzazione dei microtubuli

La disfunzione della proteina tau è spesso associata all'instabilità dei microtubuli. L'interruzione dei microtubuli è stata descritta in diversi modelli animali, tra cui topi transgenici che sovra esprimono la proteina Tau di tipo selvaggio (T44 modello) o P301S umana 4R1N tau (modello PS19)(Yoshiyama et al., 2007). I risultati di questi studi hanno dimostrato che garantire la stabilizzazione dei microtubuli potrebbe essere una strategia terapeutica efficace. Lo stabilizzatore di microtubuli Epotilone D migliora il trasporto assonale, la funzione motoria e aumenta anche il numero di microtubuli nelle linee transgeniche murine (Brunden et al., 2010)(B. Zhang et al., 2012). Un altro stabilizzatore di microtubuli, il Davunetide (indicato anche come NAP, un peptide corto), era in fase di studio II/III. Tuttavia, non ha beneficio terapeutico (Boxer et al., 2014).

Inibizione dell'aggregazione tau

Inibire l'aggregazione di tau è una via terapeutica promettente. Il Phenothiazine blu di metilene, che è stato considerato come il primo composto per prevenire l'aggregazione di tau (Wischik et al., 2015), ha dimostrato una grande efficienza nel trattamento dei deficit cognitivi in uno studio di fase II in AD di fase lieve o moderata. Un derivato del blu di metilene (LMTX) è in fase di sperimentazione III (Wischik et al., 2015).

Targeting delle modifiche post-traduzionali

Si ritiene che l'iperfosforilazione di tau sia un passaggio estremamente importante e necessario nella neurodegenerazione che può essere ottenuta inibendo le chinasi o stimolando fosfatasi, e quindi sarà uno degli obiettivi terapeutici per AD e altre tauopatie. Molte tau chinasi che coinvolgono AD, GSK-3 e CDK5 sono considerate i migliori bersagli terapeutici (Kremer, Louis, Jaworski, & Van Leuven, 2011)(Pei et al., 1999). Tideglusib (NP-12), un inibitore specifico GSK-3, è stato testato in studi clinici di fase II in AD e PSP. In AD, Tideglusib non ha prodotto alcun beneficio clinico (Lovestone et al., 2015); mentre ha ridotto la progressione dell'atrofia cerebrale in PSP (Höglinger et al., 2014). Anche altre chinasi (CDK5, CK1 e MAPK) sono considerate bersagli per

l'inibizione della tau fosforilazione. Tuttavia, non sono entrate in prova clinica fino ad oggi. PP2A, come la principale fosfatasi di tau, è stato ipotizzato come un altro bersaglio terapeutico. Consiste di subunità catalitiche α (C), un'impalcatura (A) e un regolatore (B). L'acido folico, presente in basse concentrazioni nei pazienti con AD, contribuisce ad aumentare i livelli di omocisteina e promuove la metilazione di PP2Ac, aumentando successivamente la formazione di PP2A attivo (Sontag et al., 2008). Allo stesso modo, è stato trovato che il farmaco anti-diabetico Metformina insieme a basse dosi croniche di selenito di sodio hanno migliorato l'attività di PP2A e sensibilmente diminuisce la fosforilazione di tau nei topi (van Eersel et al., 2010).

Immunizzazione Tau

L'immunoterapia è considerata una strategia promettente nella terapie per le tauopatie. Sulla base di sette studi (cinque studi con immunizzazione attiva contro tau e due studi con immunizzazione passiva), le vaccinazioni hanno mostrato impatti positivi sulla tau transgenica in modelli murini (Asuni, Boutajangout, Quartermain, & Sigurdsson, 2007)(Boimel et al., 2010)(Boutajangout, Quartermain, & Sigurdsson, 2010)(Boutajangout, Ingadottir, Davies, & Sigurdsson, 2011)(Chai et al., 2011)(Bi, Ittner, Ke, Götz, & Ittner, 2011)(Troquier et al., 2012). Recentemente, Kfoury et al. riportano che la propagazione degli aggregati di tau è bloccata da un anticorpo monoclonale anti-tau in un sistema in vitro (Kfoury, Holmes, Jiang, Holtzman, & Diamond, 2012). Probabilmente gli anticorpi entrano nei neuroni e agiscono sugli aggregati di tau intracellulari. Tali anticorpi potrebbero entrare nei neuroni attraverso endocitosi clatrina-mediata che avviene successivamente al legame con i recettori Fc γ e prevenire la progressiva neurodegenerazione (Kondo et al., 2015). La modalità di attività dell'anticorpo tauspecifico sono ancora sconosciuti.

Trattamenti anti-infiammatori

L'infiammazione contribuisce in modo significativo alla patogenesi dell'AD e svolge anche un ruolo importante in altre tauopatie (Akiyama et al., 2000)(Tarkowski, Andreasen, Tarkowski, & Blennow, 2003). Quindi, trattamenti con farmaci antiinfiammatori potrebbero essere un efficace trattamento terapeutico per le tauopatie.

Topi transgenici privati del recettore della fractalina, il microglial-specifico CX3CR1 (ha un effetto antinfiammatorio sulla microglia) mostrano patologie più gravi di tau (Bhaskar et al., 2010). Diversi studi clinici sono stati condotti su infiammazioni mirate, ma i risultati non sono chiari.

Down-regulation di tau

Sebbene non sia ancora chiaro quali entità svolgano funzioni neurotossiche nelle tauopatie, studi riguardanti topi tau-knockout hanno dimostrato che i livelli di tau sono importanti per la neurodegenerazione tau-mediata. Come approccio terapeutico, potrebbe essere usata al riguardo la down-regulation di tau attraverso oligonucleotidi antisenso, microRNA (miRNA), piccoli RNA interferenti (siRNA) o altra trascrizione inibitori.

1.2 Amiloide- β : ruolo fisiologico?

Sebbene il peptide dell'amiloide- β ($A\beta$) sia stato ampiamente imputato come la molecola neurotossica d'eccellenza nella malattia di Alzheimer, resta il fatto che l' $A\beta$ è prodotta e secreta

dai neuroni per tutta la durata della vita. Peptidi $A\beta$ sono costantemente presenti nel sistema nervoso centrale, anche in assenza di qualsiasi patologia (Shoji & Kanai, 2001). Nel campo dell'AD, molte delle ricerche condotte si sono focalizzate su concentrazioni molto elevate e/o gruppi aggregati di $A\beta$, e di solito si tratta di $A\beta_{42}$, che è il prodotto di clivaggio più incline all'aggregazione ma minoritario (Christian Haass & Selkoe, 2007). Tuttavia, rimane da capire quali siano le normali funzioni fisiologiche di $A\beta$, che si verificano con concentrazione molto più bassa e include il peptide $A\beta_{40}$ quantitativamente più presente rispetto a $A\beta_{42}$. Possiamo comprendere a fondo il coinvolgimento di $A\beta$ nella patogenesi dell'AD se non riusciamo a comprendere i suoi ruoli e vie di segnalazione in condizioni non patologiche?

Di sicuro le ricerche sul ruolo/i fisiologico/i di $A\beta$ completeranno la ricerca dell'AD e illumineranno gli sforzi sulla scoperta di nuovi farmaci.

1.2.1. APP Trafficking and Processing

isoforme 770- e 751-aminoacidi contenenti un dominio dell'inibitore della proteasi Kunitz sono espresse in cellule non neuronali, comprese le cellule gliali e endoteliali (Mattson, 1997). Tuttavia, la rilevanza funzionale dell'espressione specifica del tipo di cellula delle varianti di splicing APP rimane scarsamente comprensibile.

L'APP è espressa ubiquitaria in un'ampia varietà di tessuti, essendo particolarmente abbondante nel cervello (Allinquant, Moya, Bouillot, & Prochiantz, 1994)(Simons, Ikonen, et al., 1995)(Simons, Tienari, Dotti, & Beyreuther, 1995)(Yamazaki, Nakano, Imazu, & Terashi, 1995)(Brunholz et al., 2012), sebbene la sua funzione biologica rimanga poco chiara. Nei neuroni, l'APP può agire come fattore trofico, poiché è richiesto in diversi processi come la sinaptogenesi, il rimodellamento della sinapsi e la crescita dei neuriti (Hui Zheng & Koo, 2006)(Tyan et al., 2012). Inoltre, l'espressione di APP è aumentata sia in condizioni fisiologiche, come durante la maturazione e differenziazione neuronale, sia in situazioni patologiche come AD, DS e lesioni craniche (Buoso, Lanni, Schettini, Govoni, & Racchi, 2010).

Inizialmente, dopo la traduzione, l'APP immaturo attraverso il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi subiscono una serie di modifiche post-traduzionali, tra cui N- e O-glicosilazione, fosforilazione e tirosina solfatazione. La proteina APP modificata e matura viene quindi trasportata in vescicole secretorie alla membrana plasmatica tramite meccanismi di trasporto assonale che coinvolgono la chinesina-1, un importante motore molecolare dipendente dai microtubuli (Brunholz et al., 2012)(Szodorai et al., 2009). Questo avviene tramite traffico anterogrado lungo gli assoni (Kamal, Stokin, Yang, Xia, & Goldstein, 2000)(Koo et al., 1990). In cellule non neuronali (in coltura), in condizioni basali, la maggior parte della popolazione di APP non rimane sulla superficie della cellula ma viene invece trovata nell'apparato del Golgi e nella rete trans-Golgi (TGN). Ciò è dovuto a un motivo di interiorizzazione YENPTY che porta a endocitosi, mediante la quale una parte delle molecole di APP vengono processate attraverso il riciclaggio endosomiale attraverso la superficie cellulare e un'altra parte invece è destinata alla degradazione lisosomiale. Dopo l'inserimento nella membrana plasmatica, l'APP può essere reinternalizzata negli endosomi la quale può essere riciclata sulla superficie cellulare, portata poi ai lisosomi per la degradazione o ridistribuita in compartimenti

cellulari lontani attraverso la transitosi (Back et al., 2007)(T E Golde, Estus, Younkin, Selkoe, & Younkin, 1992)(C Haass, Koo, Mellon, Hung, & Selkoe, 1992)(C Haass, Schlossmacher, et al., 1992)(Tienari et al., 1996) (Christian Haass, Kaether, Thinakaran, & Sisodia, 2012). Inoltre, APP e i suoi frammenti proteolitici (compresa A β) sono stati osservati nei mitocondri (Devi, Prabhu, Galati, Avadhani, & Anandatheerthavarada, 2006)(Lustbader et al., 2004)(Manczak et al., 2006). Nei neuroni, la maggior parte dell'APP viene inizialmente fagocitata dalla rete trans-Golgi alla membrana assonale e quindi agli endosomi, da dove può anche essere reindirizzata al compartimento dendritico tramite la transitosi (Tienari et al., 1996). La maggior parte dell'APP si trova all'interno dei compartimenti intracellulari e solo il 10% -20% è presente nella membrana plasmatica (Thinakaran & Koo, 2008). Durante lo sviluppo, l'APP è depositata nei coni di crescita dei neuriti in via di sviluppo. Nei neuroni più maturi, l'APP si localizza nei siti di adesione focale e nelle strutture pre-e postsinaptiche del tessuto nervoso centrale e periferico, suggerendo un ruolo funzionale nella crescita neuritica e nella plasticità sinaptica (Sabo, Ikin, Buxbaum, & Greengard, 2003).

L'APP è processata attraverso due diversi percorsi, i percorsi non amiloidogenico e amiloidogenico. Inoltre, è stato recentemente descritto un terzo percorso di elaborazione dell'APP. Questo percorso, la via η -secretasi, è anche in grado di generare diversi frammenti di peptidi extracellulari e intracellulari (Willem et al., 2015) (Figura 9).

Il percorso di elaborazione non-amiloidogenico è caratterizzato dalla mancata produzione del peptide A β . APP viene scissa dalla α -secretasi all'interno del dominio A β , impedendo la generazione di peptide A β e promuovendo il rilascio di un ectodominio solubile di APP (sAPP α). Il restante frammento C-terminale (CTF- α) viene successivamente scisso dalla γ -secretasi, liberando il peptide non tossico P3 e il dominio intracellulare APP (AICD). Secondo numerosi studi, frammenti di AICD rilasciati nel citoplasma sono rapidamente degradati in frammenti più piccoli dal proteosoma, dall'enzima di degradazione dell'insulina (IDE) o dalla catepsina B, rendendo l'AICD non funzionale. In alternativa, AICD può anche essere abbreviato da C31 da caspase-3 (Grimm et al., 2013)(Dawkins & Small, 2014).

Nella via non amiloidogena, l'APP viene prima scissa dalla α -secretasi all'interno della sequenza A β per generare 2 frammenti proteolitici: sAPP α (una proteina secreta che comprende la maggior parte dell'ectodominio APP) e C83 (uno stub proteico che rimane legato alla membrana plasmatica per un'ulteriore elaborazione proteolitica). Sulla superficie cellulare, l'APP puo' essere lisata dall' α -secretasi. Proteolisi come metalloproteinasi, incluse ADAM9, ADAM10, ADAM17, MDC9 e la proteasi BACE2, possono funzionare come α -secretasi, scindendo APP in un sito situato all'interno della sequenza AB (Kojro & Fahrenholz, 2005). Il grande ectodominio sAPP α e' posto nella parte extracellulare dove svolge molteplici funzioni di segnalazione nella modulazione dell'attivita' sinaptica, crescita dei neuriti, sinaptogenesi, proliferazione neuronale e sopravvivenza cellulare (Caillé et al., 2004)(Mattson, 1997).

La via di processamento amiloidogenico è caratterizzata dalla produzione di peptide A β . APP viene scissa dalla β -secretasi all'interno del dominio extracellulare in posizione 671, eliminando un ectodominio solubile di APP (sAPP β). Il restante frammento C-terminale (CTF- β) viene successivamente processato dalla γ -secretasi, rilasciando il peptide Ap e il frammento AICD nel citoplasma (Grimm et al., 2013)(Thinakaran & Koo, 2008). Contrariamente a quanto avviene durante il processo non amiloidogenico, i frammenti AICD rilasciati dalla scissione della γ -secretasi, dopo l'elaborazione della β -secretasi possono essere stabilizzati dalla proteina dell'adattatore Fe65 nel citoplasma, evitando la degradazione dell'AICD. Il complesso AICD-Fe65 è stato suggerito per traslocare nel nucleo dove forma un complesso trascrizionalmente attivo con Tip60, un'istone acetiltransferasi, che regola l'espressione di diversi geni bersaglio (Cao & Südhof, 2001).

Nella via amiloidogena, nel Golgi e negli endosomi, l'APP viene scissa dalla β -secretasi BACE1 al terminale N della sequenza A β , generando così una proteina secreta (sAPP β) e un frammento associato alla membrana noto come C99 comprendente l'intera sequenza A β . Entrambi gli stub C99 e C83 possono essere, successivamente scissi dal complesso della γ -secretasi (proteolisi intramembrana) all'interno del dominio transmembrana, nel RE, nel Golgi, endosoma, determinando il rilascio di peptidi A β o p3 nel lume, rispettivamente, e il dominio intracitoplasmatico di APP (AICD). Poiché la

scissione della γ -secretasi è eterogenea, possono essere generati peptidi $A\beta$ di varie lunghezze, con $A\beta_{1-40}$ il più abbondante e solubile e l' $A\beta_{1-42}$ il più incline all'aggregazione (Jarrett, Berger, & Lansbury, 1993)(McGowan, Eriksen, & Hutton, 2006).

Ci sono due principali specie monomeriche di peptide $A\beta$ prodotte dalla scissione di β -secretasi di APP: $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$. Circa il 90% di tutti i frammenti di $A\beta$ generati sono 40 aminoacidi ($A\beta_{40}$) di lunghezza, e il 42 peptide di aminoacidi ($A\beta_{42}$) è più incline a formare oligomeri e fibrille (Sisodia & St George-Hyslop, 2002). I peptidi $A\beta$ isolati dal tessuto cerebrale affetto da AD variano in lunghezza da 39 a 43 aminoacidi (Burnouf, Gorsky, Dols, Grönke, & Partridge, 2015)(Sandebring, Welander, Winblad, Graff, & Tjernberg, 2013)(Keller et al., 2010)(Welander et al., 2009)(Miravalle et al., 2005). La forma predominante che si trova nei pazienti con AD è $A\beta_{42}$, che ha un'importanza patologica in quanto forma fibrille insolubili tossiche che si accumulano formando placche $A\beta$ (Dennis J Selkoe & Hardy, 2016)(McGowan et al., 2005).

I peptidi $A\beta$ si riuniscono in varie forme aggregate, che vanno da dimeri e oligomeri a fibrille (Hardy & Selkoe, 2002). Questa versatilità ha un'importanza rilevante perché diversi aggregati hanno proprietà citotossiche e biologiche/fisiologiche differenti.

Vale la pena notare che la via non amiloidogena è la principale via di elaborazione, ma la ragione per cui APP favorisce una via piuttosto che l'altra è scarsamente comprensibile (Christian Haass et al., 2012). Una delle ipotesi più accettate è che l'APP si accumuli in ispessimenti lipidici nella membrana cellulare, che spinge la proteina nella via amiloidogena, portando così alla produzione di peptidi $A\beta$ (Ehehalt, Keller, Haass, Thiele, & Simons, 2003).

La via η -secretasi è una via di elaborazione alternativa che si verifica in condizioni fisiologiche e che può essere interessata durante l'AD e la DS. APP è scisso in posizione 505 dalla η -secretasi all'interno del dominio extracellulare, rilasciando un ectodominio solubile di APP ($sAPP-\eta$). Il restante frammento C-terminale (CTF- η) viene

ulteriormente elaborato dalla α -secretasi o β -secretasi, liberando il peptide A η -a (lasciando un frammento CTF- α) o il peptide A η - β (lasciando un CTF- β), rispettivamente, nel mezzo extracellulare. Il CTF- α e il CTF- β lasciati nella membrana cellulare possono essere ulteriormente processati dalla γ -secretasi rilasciando l'AICD al citoplasma. Le possibili funzioni dei peptidi prodotti in questo percorso non sono ancora ben note, anche se è stato riportato che il peptide A η -a può inibire l'attività neuronale nell'ippocampo del topo in condizioni fisiologiche (Willem et al., 2015). Altre vie alternative sono la via della δ -secretasi (Z. Zhang et al., 2015) e la via della meprina (Jefferson et al., 2011), in cui frammenti N-terminali aggiuntivi vengono rilasciati al mezzo extracellulare (Norstrom, 2017).

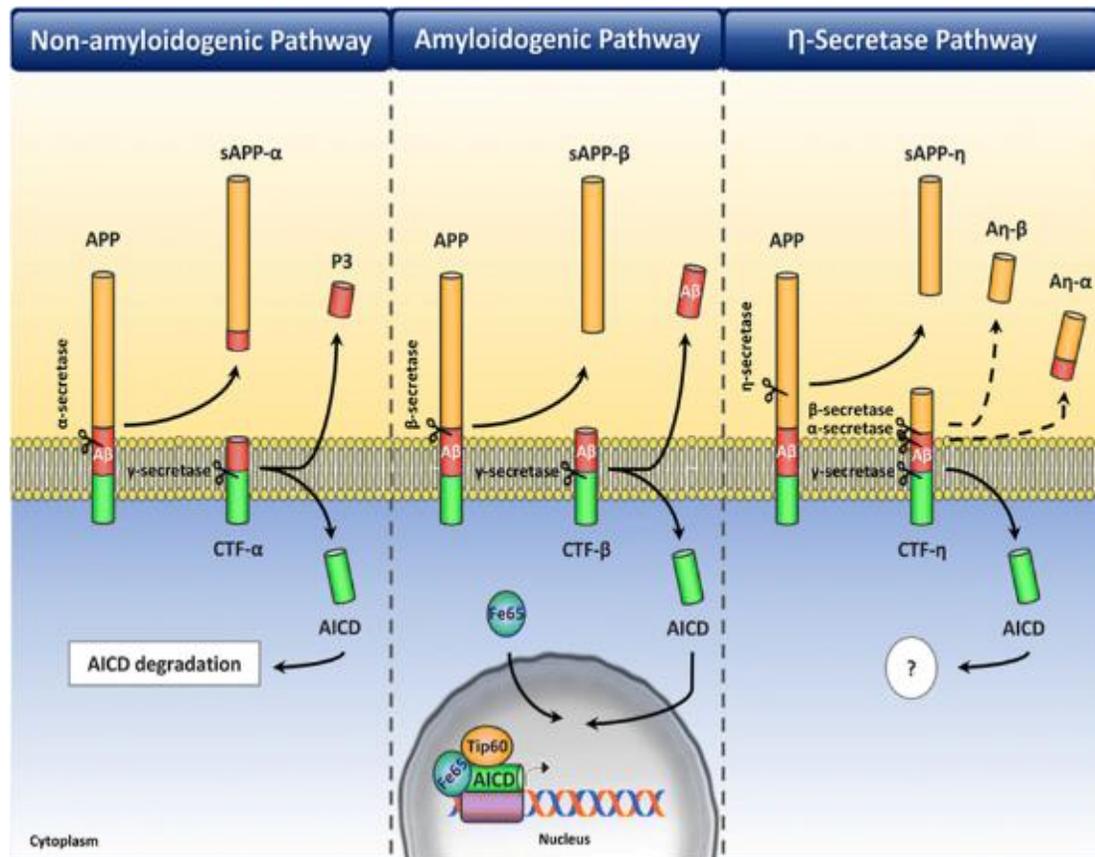


Figura 9. Le vie di processamento della proteina precursore dell'amiloide (APP). L'APP può essere sottoposta a trattamento non amiloidogenico, amiloidogenico o η -secretasi. Nella via non amiloidogenica (a sinistra), la scissione di α -secretasi all'interno del dominio A β provoca la formazione di sAPP α e il CTF- α legato alla membrana, che a sua volta viene scisso dalla γ -secretasi con conseguente rilascio del peptide P3 e AICD; in questo percorso, l'AICD è rapidamente degradato. Nella via amiloidogenica (al centro), la scissione della β -secretasi porta alla formazione di sAPP β e CTF- β , che a loro volta vengono scissi dalla γ -secretasi con conseguente rilascio del peptide A β e AICD. In questo percorso, l'AICD può essere traslocato nel nucleo e regolare l'espressione genica. Nella via η -secretasi (a

destra), la scissione di η -secretasi porta alla formazione di sAPP- η e CTF- η , che a loro volta vengono scissi dalla β -secretasi o α -secretasi con conseguente rilascio di A η - β o Peptidi A η -a, rispettivamente, e AICD (Coronel et al., 2018).

1.2.2. Funzioni fisiologiche di APP

Varie funzioni cellulari sono state proposte per APP, ma il ruolo/i fisiologico/i effettivo/i di questa proteina rimane oggetto di dibattito (Mattson, 1997)(Thinakaran & Koo, 2008). Nei primi studi, si osservò che la diminuzione dei livelli di APP era correlata alla riduzione della crescita cellulare (Saitoh et al., 1989)(D J Selkoe, 1994) mentre a livello neuronale, l'APP ha un ruolo fondamentale nella crescita del neurite (W. Q. Qiu, Ferreira, Miller, Koo, & Selkoe, 1995). Un particolare dominio di APP, sAPP α , è stato trovato essere coinvolto nella modulazione della plasticità sinaptica, della densità sinaptica e del funzionamento cognitivo (Ishida, Furukawa, Keller, & Mattson, 1997)(Ring et al., 2007)(Turner et al., 2003).

Come discusso sopra, è evidente che APP e almeno uno dei suoi prodotti di clivaggio siano coinvolti nella fisiologia neuronale. Potrebbe anche il peptide A β "amiloidogenico" e il suo pathway avere un ruolo nel normale funzionamento neuronale e sinaptico?

Al contrario, il ruolo/i fisiologico/i dei peptidi A β non sono così ben compresi, nonostante sia noto che l'A β è un normale prodotto metabolico cellulare dai primi anni '90 (C Haass, Schlossmacher, et al., 1992). I topi knockout per app sono vitali e fertili, indicando che la perdita di APP non è essenziale per lo sviluppo embrionale e/o il controllo delle funzioni vitali (G. Li et al., 1996). Ciononostante, i topi APP $-/-$ mostrano alcune anomalie fenotipiche, tra cui riduzione del peso corporeo, diminuzione dell'attività locomotoria e resistenza all'aderenza all'arto anteriore, difetti nel potenziamento a lungo termine e compromissione dell'apprendimento e della memoria (Ring et al., 2007)(Dawson et al., 1999). In questi animali è stato riscontrato un aumento della gliosi reattiva, ma non è stata osservata alcuna evidente degenerazione neuronale (H Zheng et al., 1995).

Viceversa, un modello di topo transgenico che sovra esprime l'APP umana di tipo selvaggio (Tg5469) mostra una maggiore plasticità e memoria sinaptica dell'ippocampo; questi aumenti sono stati trovati dipendenti dall'attività di BACE1 (H. Ma et al., 2007). Tuttavia, oltre ai peptidi A β , il trattamento con BACE1 porta anche ad altri prodotti di

clivaggio (ad esempio sAPP β) e quindi preclude anche un supporto definitivo per il coinvolgimento dei peptidi A β nel potenziamento sinaptico osservato.

In contrasto con questa scoperta, un altro studio che utilizza la transfezione virale delle sezioni ippocampali organotipiche ha trovato che APP sovraespresso è critico per la vitalità neuronale in vitro (Plant, Boyle, Smith, Peers, & Pearson, 2003). Ancora una volta, questo effetto è stato osservato con concentrazioni molto basse, a partire da 10 pM. Mentre questi studi hanno fornito prove evidenti per le proprietà trofiche di A β a basse concentrazioni, rilevanti, dal punto di vista fisiologico, poco si sapeva del potenziale coinvolgimento di A β nella modulazione della plasticità sinaptica. Il laboratorio del Professor Arancio è stato il primo ad affrontare direttamente questo problema in modo acuto somministrando quantità picomolari di A β e valutandone gli effetti sulla plasticità sinaptica a lungo termine e sulla memoria. Ha scoperto infatti che applicare una quantità picomolare di A β 42 (200 pM) a fette di ippocampo di topo WT porta a un sensibile miglioramento della plasticità sinaptica, come misurato da un aumento statisticamente significativo del potenziamento a lungo termine (Puzzo et al., 2008). Inoltre l'infusione di peptidi A β 42 da 200 pM direttamente in vivo nell'ippocampo ha migliorato l'apprendimento e la memoria nei topi adulti. Nella situazione opposta, riducendo i livelli di A β nel roditore con anticorpi anti-A β o siRNA viene inibita sia la plasticità sinaptica che la memoria (Puzzo et al., 2011).

1.2.3. Ruoli di APP sull'adesione cellulare, neuritogenesi e plasticità sinaptica

Si pensa che i membri della famiglia di APP possano giocare un ruolo nelle interazioni cellula-cellula e cellula-substrato. Ad esempio, le forme associate a membrana di APP, APLP1 e APLP2 promuovono l'adesione cellula-cellula attraverso l'omo e l'eterodimerizzazione (Baumkötter, Wagner, Eggert, Wild, & Kins, 2012). Inoltre, negli esperimenti di trasferimento dell'energia di risonanza di Förster, utilizzando punti quantici, hanno rivelato un'interazione ligando/recettore tra il frammento APP proteolitico (sAPP) e l'holo-APP nella membrana plasmatica (Gralle, Botelho, & Wouters, 2009), suggerendo un legame tra le attività funzionali di sAPP e holo-APP. Inoltre, l'holo-APP può formare dimeri antiparalleli attraverso interazioni che coinvolgono il dominio E2 (Yongcheng Wang & Ha, 2004), sia il dominio E1 che il

motivo GAIIG all'interno della regione transmembrana svolgono anch'essi un ruolo nella dimerizzazione dell'APP (Kaden et al., 2008). Inoltre, il legame dell'eparina ai domini E1-E2 promuove anche la dimerizzazione dell'APP (Gralle et al., 2006). Fornendo una conseguenza fisiologica per queste interazioni, la dimerizzazione della APP ha mostrato di influenzarne l'elaborazione da parte delle secretasi (Kaden et al., 2008)(Munter et al., 2007).

Poiché la porzione extracellulare di APP contiene vari domini strutturali, non sorprende che siano stati identificati diversi ligandi fisiologici per APP. È interessante notare che molti di questi ligandi sono componenti della matrice extracellulare e proteine correlate all'adesione cellulare tra cui proteoglicani eparan solfato, laminina, collagene di tipo I, spondina F, recettore Nogo-66, reelin, netrina e integrina $\alpha 3\beta 1$ (Behr, Hesse, Masters, & Multhaup, 1996)(Kibbey et al., 1993)(Hoe et al., 2009). È importante sottolineare che il legame dell'APP a ciascuna di queste molecole influisce in modo differenziale sulla sua distribuzione cellulare e/o sull'elaborazione metabolica da parte delle secretasi, indicando che queste interazioni sono funzionalmente rilevanti. Ad esempio, il legame di F-spondina al dominio E2 centrale di APP impedisce la sua scissione da parte delle secretasi (Ho & Südhof, 2004). Inoltre, il legame reelin al dominio E1 migliora l'elaborazione non amiloidogena di APP (Hoe et al., 2006). Infine, la netrina risulta interagire con APP all'interno del dominio A β e questa interazione si traduce in una riduzione della generazione di A β (Lourenço et al., 2009).

Il ruolo di APP e dei suoi frammenti proteolitici sulla regolazione della plasticità sinaptica è stato ampiamente documentato. Ad esempio, alcuni studi hanno rilevato un aumento del numero di sinapsi nelle aree corticali dei topi transgenici che sovraesprimono l'APP umana di tipo selvatico (Mucke et al., 1994). Più recentemente, è stato dimostrato che l'APP regola l'espressione e l'attività presinaptica del trasportatore della colina ad alta affinità nelle giunzioni neuromuscolari. Utilizzando topi APLP2 $^{-/-}$, che consentono anche la deplezione condizionale di APP in motoneuroni o muscoli, è stato determinato che la corretta formazione e funzione delle sinapsi neuromuscolari richiedono l'espressione di APP in entrambe le membrane pre- e postsinaptiche. Inoltre,

l'espressione di APP nelle cellule HEK in cocultura con neuroni primari ha indotto la formazione di emisinapsi. Sulla base di queste osservazioni, l'APP è stata proposta per rappresentare una nuova classe di molecole di adesione sinaptica con proprietà biochimiche simili a quelle riportate per neurexine/neurologine, SynCAM e proteine neuronali transmembranaliche ricche di leucina (Baumkötter et al., 2012)(H. Wang et al., 2009). Collettivamente, queste osservazioni suggeriscono che le attività neuritogeniche e sinaptogeniche di APP implicano la modulazione delle interazioni cellula-cellula e substrato cellulare e anche le proprietà omo- e eterodimerizzazione di questa molecola. Modulando la dimerizzazione e l'elaborazione delle APP da parte delle secretasi, diversi componenti extracellulari e proteine di membrana regolerebbero ulteriormente la funzione APP.

1.2.4. Regolazione dei pathway intracellulare mediante APP

Il più alto grado di omologia tra i membri della famiglia APP si trova all'interno del loro dominio intracellulare, suggerendo che questa regione svolga un ruolo funzionale critico. Infatti, il dominio citoplasmatico di tutti i membri della famiglia APP contiene un motivo GYENPTY, che media la loro interazione con diverse proteine, tra cui Fe65, proteine della famiglia Mint/X11, Dab1, c-Jun N-terminale chinasi, Shc e Grd2, tra gli altri (Matsuda et al., 2001)(McLoughlin & Miller, 2008)(Russo et al., 2005)(Y. Saito et al., 2011). Inoltre, l'interazione di APP con queste proteine modula la generazione del frammento AICD. Il significato di questa modulazione si basa sui rapporti secondo cui AICD, Fe65 e Tip60 possono formare un complesso trascrizionale tripartito che controlla l'espressione di diversi geni, tra cui KAI1, neprilisina, LRP1 e recettore EGF (Baek et al., 2002)(Pardossi-Piquard et al., 2005)(Y. Zhang et al., 2007). La somiglianza tra l'APP e l'elaborazione di Notch 1 da parte della secretasi e la regolazione della trascrizione genica da parte di frammenti proteolitici derivati da queste proteine appaiono coerenti con un ruolo di APP come recettore di superficie cellulare.

Generalmente si presume che i recettori accoppiati alle proteine G eterotrimeriche, inclusi Go e Gs, debbano avere una struttura a 7 domini transmembrana. Tuttavia, prove crescenti indicano che singole proteine del dominio transmembranico, tra cui recettore

del fattore di crescita epidermico, recettore dell'insulina, recettore del fattore di crescita simile all'insulina, recettore del fattore di crescita dei fibroblasti e recettore del recettore del peptide natriuretico di tipo C, possono anche interagire e segnalare attraverso le proteine G (Patel et al., 2005). Una sequenza consenso per il legame alle proteine Go è stata identificata nel dominio intracellulare di APP (Nishimoto et al., 1993). Esperimenti in vitro hanno confermato questa interazione, rivelando ulteriori istidine nelle posizioni 657-658 (APP695) come residui critici per questa interazione (Brouillet et al., 1999)(Okamoto, Takeda, Murayama, Ogata, & Nishimoto, 1995). Più recentemente, è stato anche osservato che un motivo RHLSK all'interno del dominio intracellulare di APP media un'interazione con Gs (Deyts et al., 2012). Estendendo queste osservazioni, è stato osservato che APPL, l'omologo della Drosophila APP dei mammiferi, colocalizza con Go nei neuroni migratori (Swanson et al., 2005) e regola la struttura e il numero sinaptico in modo da richiedere sia il sito di legame della proteina Go che il motivo GYENPTY (Torroja, Packard, Gorczyca, White, & Budnik, 1999). Inoltre, è stato dimostrato che l'APP promuove la crescita assonale e dendritica nei neuroni dei mammiferi attraverso un meccanismo che implica l'attivazione di Gs-dipendente (Deyts et al., 2012). Pertanto, attraverso le interazioni tra il suo dominio intracellulare e vari partner di legame, comprese le proteine G, l'APP associata alla membrana modula l'attivazione di varie cascate di segnalazione intracellulare.

1.3 La proteina tau

1.3.1 Genetica molecolare, espressione e struttura di tau

La proteina Tau associata ai microtubuli (MAPT) è codificata da un singolo gene, MAPT, che comprende 16 esoni sul cromosoma 17q21 (Figura 10 e 11). La proteina tau umana è composta da quattro aree: una regione N-terminale, un dominio ricco di prolina, un dominio di legame al microtubulo (MBD) e una regione di proiezione C-terminale (Morris, Maeda, Vossel, & Mucke, 2011).

Ci sono sei principali isoforme di tau espresse nel cervello dell'uomo, che sono generati da splicing alternativo intorno alla regione N-terminale [esone 2 (E2) ed E3] e MBD (E10). Differiscono tra loro a seconda del numero di inserti amminoacidici e la presenza

di tre sequenze di ripetizione leganti i microtubuli 3R o 4R (Goedert, Spillantini, Potier, Ulrich, & Crowther, 1989).

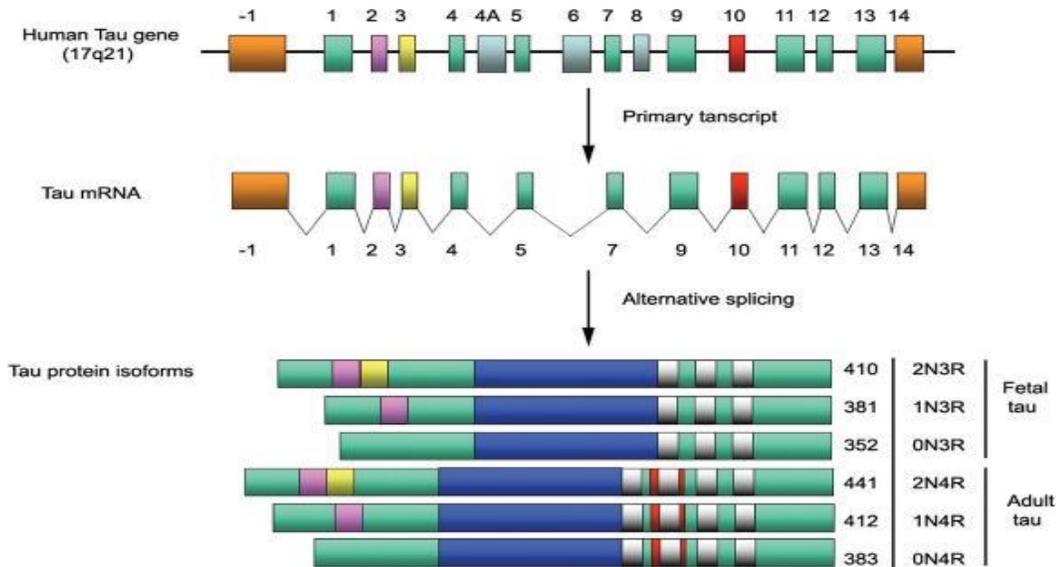


Figura 10. Schema del gene tau e delle isoforme proteiche nel cervello umano.

Gli esoni 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 e 13 sono esoni costitutivi, mentre gli esoni 1, 4A, 6, 8 e 14 non lo sono. Gli esoni 2 (in viola), 3 (in giallo) e 10 (in rosso) sono alternativamente congiunti per produrre proteine tau con 3R (fetale) o 4R (adulto) a seconda della presenza o assenza dell'esone 10 (4R o 3R) e 0 (0N), 1 (1N) o 2 (2N) inserti N-terminali codificati dagli esoni 2 e 3 (J.-Z. Wang, Gao, & Wang, 2014).

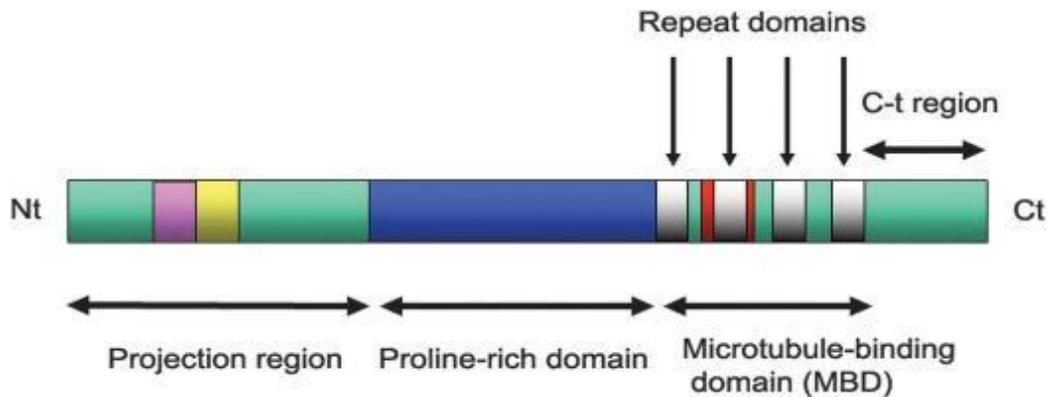


Figura 11. Schema che mostra le sotto-regioni della proteina tau. Tau è suddiviso in quattro regioni: la regione acida nella regione di proiezione N-terminale (Nt), la regione ricca di prolina, la regione responsabile del legame di tau con i microtubuli che contiene quattro domini ripetuti (MBD), cioè R1, R3, R4 e R2 (in grigio) e la regione C-terminale (J.-Z. Wang et al., 2014).

1.3.2 Funzioni biologiche di tau

Come proteina associata ai microtubuli, si ritiene che la funzione primaria di tau sia essenziale per la regolazione della struttura dei microtubuli promuovendone l'assemblaggio, mantenendo la stabilità di questi e controllando la dinamica legandosi

alla superficie del microtubulo attraverso la MBD e le regioni adiacenti. Tau si rivela pertanto uno dei componenti principali del citoscheletro neuronale che definisce la normale morfologia/struttura dei neuroni e serve come tracce per il trasporto assonale legandosi al microtubulo. Basato sulla distribuzione graduale di tau lungo l'assone, il carico può essere liberato dalle proteine motorie, aumentandone l'efficienza del trasporto assonale (Dixit, Ross, Goldman, & Holzbaur, 2008)(Mandell & Banker, 1996). Grazie all'utilizzo di topi tau-knockout si sono scoperte nuove funzioni di tau, come il controllo dell'integrità del DNA genomico (Violet et al., 2014)(Sultan et al., 2011), regolazione di attività neuronale (Gheyara et al., 2014)(Leroy et al., 2012)(DeVos et al., 2013), neurogenesi (Hong et al., 2010), trasporto del ferro (Lei et al., 2012). È ben noto che tau anormalmente iperfosforilata si stacca dal microtubulo e quindi causa lo smontaggio di quest'ultimo mentre la defosforilazione ripristina il legame e l'assemblaggio del microtubulo delle proteine tau (J. Z. Wang, Gong, Zaidi, Grundke-Iqbal, & Iqbal, 1995). L'iperfosforilazione causa anche l'accumulo intracellulare delle proteine tau e quindi riduce la velocità di trasporto anterograda e retrograda della proteina tau negli assoni (Yang et al., 2007).

Attualmente, non è del tutto chiaro se e in che misura tau anormale possa interagire con i motori molecolari, come KLC (catena leggera kinesina, responsabile del legame del carico durante il trasporto anterogrado) e del DIC (catena intermedia dineina, un componente del complesso della dinaina durante trasporto retrogrado), per causare danni al trasporto assonale. Essendo una delle principali proteine associate ai microtubuli, la maggior parte degli studi sulla tau sono stati focalizzati sulle sue funzioni all'interno del citoscheletro. Studi recenti dimostrano che la proteina tau è anche attivamente coinvolta nella regolazione della vitalità cellulare e dell'attività. Come substrato competitivo di GSK-3 β , la fosforilazione tau può preservare i fattori di sopravvivenza, come la β -catenina, e quindi proteggere le cellule da una morte apoptotica acuta (H.-L. Li et al., 2007). Ulteriori lavori suggeriscono anche che le proteine tau sono coinvolte in più vie di segnalazione cellulare. Il legame di tau con i domini SH3 della tirosina chinasi della famiglia Src può indirizzare tau alla membrana plasmatica dove tau può svolgere un ruolo negli eventi di segnalazione associati alla membrana. La posizione dendritica di tau media l'indebolimento sinaptico indotto da A β (peptide amiloide β), mentre il knockout di

tau nei topi transgenici AD separa NMDAR (N-metil-d-aspartato recettore) -mediata eccitotossicità e quindi mitiga la tossicità data da A β (Ittner et al., 2010). Tau può attivare PLC γ (fosfolipasi-C γ) con AA (acido arachidonico), che è coinvolto nella patogenesi dell'AD. Tau può anche agire come un inibitore diretto dell'enzima quando si lega a HDAC6 (istone deacetilasi 6), una singolare ducilasi tubulina citoplasmatica, con conseguente aumento di acetilazione della tubulina. Al contrario, la perdita di HDAC6 può alleviare la deposizione anormale di tau. Più recentemente, la proteina tau è stata identificata come un'acetiltransferasi intrinseca (T. J. Cohen, Friedmann, Hwang, Marmorstein, & Lee, 2013). Simile alla proteina prionica, le proteine tau sembrano trasmissibili tra i neuroni e quindi causano neurodegenerazione. La sovraespressione di tau causa fusione mitocondriale con disfunzione mitocondriale.

Le proteine tau subiscono varie modificazioni post-traduzionali tra cui acetilazione, glicazione, glicosilazione, metilazione, nitrurazione, ossidazione, fosforilazione, polianificazione, isomerizzazione del prolile, SUMOilazione, troncamento e ubiquitinazione. Alcune delle modificazioni post-traduzionali, come la fosforilazione, la glicosilazione e l'acetilazione, sono rilevate sia in condizioni fisiologiche (sebbene a livello più basso) sia patologiche, mentre alcune di esse sono osservate solo in condizioni patologiche, come la glicazione.

Le proteine Tau estratte dal cervello adulto normale mostrano masse molecolari nell'intervallo tra i 37 e i 46 kDa (a causa dei diversi gradi di modificazione post-traslazionale) tramite elettroforesi su gel (J.-Z. Wang et al., 2014).

Comprendere le funzioni aggiuntive di tau non è solo essenziale per chiarire la patogenesi tau, ma è anche necessario per accertare la strategia terapeutica tau-based.

1.3.3 Aggregazione di Tau nell'AD

Come una proteina espressa normalmente nella cellula, tau presenta poca tendenza all'aggregazione. Le prove hanno rivelato che la molecola tau potrebbe essere soggetta a cambiamenti di conformazione per formare una struttura cosiddetta a “graffetta” a livello N-terminale, C-terminale e MBD (Jeganathan, von Bergen, Bruchmann, Steinhoff, & Mandelkow, 2006). Questa struttura a “graffetta” potrebbe impedire l'aggregazione di

tau. Una volta che la struttura è cambiata, ad esempio a causa dell'iperfosforilazione, questi domini inibitori della molecola tau sono neutralizzati e di conseguenza la proteina tau si auto-assembla in grovigli di PHF (Alonso, Zaidi, Novak, Grundke-Iqbal, & Iqbal, 2001).

L'aggregazione dei Tau potrebbe essere influenzata dalle modifiche post-traduzionali. In particolare, la fosforilazione (caratteristica comune nell' AD) è comunemente accettata per guidare l'aggregazione di tau. Altre modifiche post-traduzionali mostrano anche effetti di inibizione o promozione dell'aggregazione delle proteine tau, inclusi O-GlcNAcilazione (Yuzwa, Cheung, Okon, McIntosh, & Vocadlo, 2014), deamidazione, isomerizzazione (Watanabe et al., 2004), metilazione (Funk et al., 2014).

Studi hanno dimostrato che l'aggregazione di tau è condizione necessaria per la tossicità indotta dalla stessa. L'aggregazione di Tau diminuisce i livelli di tau funzionale solubile, sequestra alla cellula componenti o ostacolare il trasporto assonale portando inevitabilmente alla neurodegenerazione.

1.3.4 Oligomeri di tau e propagazione della patologia tau in AD

Sebbene la NFT sia un segno patologico dell'AD, crescenti prove dimostrano che la formazione di NFT potrebbe non essere necessaria per la neurodegenerazione. In alcuni casi nei topi wild-type o transgenici la perdita sinaptica, il deficit di memoria ed elettrofisiologico si sviluppano prima e senza eventuali NFT (Yipeng Wang & Mandelkow, 2016). Questi dati hanno evidenziato che la tossicità neuronale potrebbe essere indotta da specie di tau più piccole e solubili, probabilmente oligomeri. Sono stati rilevati oligomeri tau in tessuti cerebrali dei pazienti con AD e il loro livello mostra una relazione con la gravità del deficit della memoria (Berger et al., 2007). Comunque, il ruolo degli oligomeri tau rimane ancora controverso. Diversi studi hanno scoperto che l'oligomero di tau che promuove l'aggregazione di quest'ultima indurrebbe perdita neuronale e disfunzione cognitiva (Flach et al., 2012). È fuori dubbio che la patologia tau non è limitata al solo ambiente intracellulare. Basato sulla teoria della stadiazione di Braak, la patologia tau viene prima rilevata nelle regioni transentorinale ed entorinale (fase I) (Gao et al., 2018). In seguito, è stata osservata anche nell'ippocampo (fasi III e

IV) ed infine si diffonde nella corteccia (fasi V e VI) (Braak & Braak, 1991). La prova mostra che gli oligomeri non fibrillari di tau iperfosforilati sono la forma endogena di tau coinvolta nella propagazione nei neuroni primari (Takeda et al., 2015). Si presume che per la proteina tau patologica la diffusione degli oligomeri di tau (semi) avvenga per endocitosi, e via trans-sinaptica da esosomi o vescicole sinaptiche di trasferimento tra neuroni (Khan et al., 2014). Una volta che la proteina tau si ritrova nei neuroni postsinaptici, i “semi” di tau innescano successivamente l'aggregazione di tau. Oggi questo modello di propagazione e di diffusione transsinaptico è stato ampiamente accettato.

Capitolo 2

2.1 Abstract

Background: Soluble aggregates of oligomeric forms of tau protein (oTau) have been associated with impairment of synaptic plasticity and memory, therefore representing a critical hallmark in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. However, the molecular mechanisms underlying the Synaptic and memory dysfunction induced by elevation of oTau are still unknown.

Methods: Using a combination of biochemical, electrophysiological and behavioral techniques, phosphorylation of the cAMP-responsive element binding (CREB) protein, a transcriptional factor involved in memory, as well as long-term potentiation (LTP), a type of synaptic plasticity thought to underlie memory formation, and both short-term spatial and associative memory, were examined following oTau elevation with/out up-regulating the nitric oxide (NO) cascade.

Results: Phospho-CREB increase occurring during memory formation was found to be reduced after oTau elevation during memory formation. This lead us to explore whether upregulation of various components of the NO signaling pathway impinging onto CREB is capable of rescuing oTau-induced impairment of synaptic plasticity, memory and CREB phosphorylation. Increased NO levels protected against oTau-induced impairment of LTP. This beneficial effect involved the activation of soluble guanylyl cyclase and elevation of cGMP levels, which stimulate cGMP-dependent protein kinases (PKG). Pharmacological inhibition of cGMP degradation through inhibition of phosphodiesterase 5 rescued oTau-induced LTP reduction. Activation of PKG rescued oTau-induced LTP and memory impairments. Finally, elevation of cGMP levels re-established normal CREB phosphorylation after LTP induction in the presence of oTau.

Conclusions: Up-regulation of CREB activation through agents acting on the NO cascade might be beneficial against tau-induced synaptic and memory dysfunctions.

2.2 Introduzione

Il crescente interesse nella ricerca sull'AD è ora diretto verso la proteina tau, un segno distintivo della malattia. Gli aggregati insolubili di tau sono responsabili della formazione dei grovigli NFT. Le ultime ricerche si stanno sempre più focalizzando sugli aggregati solubili di tau come protagonista nell'eziopatogenesi della malattia in quanto emergono come più tossici dei grandi aggregati insolubili. Forme oligomeriche extracellulari di tau (oTau) hanno dimostrato di influenzare la memoria, e il suo correlato cellulare noto come potenziamento a lungo termine (LTP) (Fá et al., 2016)(Lasagna-Reeves et al., 2012). Tuttavia, nonostante la forte connessione tra oTau e la patologia dell'AD (Berger et al., 2007)(Brunden, Trojanowski, & Lee, 2008), il meccanismo molecolare con cui la proteina tau induce disfunzione sinaptica e la compromissione della memoria rimangono sconosciuti.

Esiste un ampio consenso sul fatto che la proteina cAMP (adenosina monofosfato ciclica) binding responsive element (CREB) svolga un ruolo chiave nel consolidamento della memoria. La modificazione della fosforilazione di CREB è una modifica post-trascrizionale coinvolta nei meccanismi di trascrizione genica che portano alla plasticità e formazione della memoria (Lee & Silva, 2009), ed è probabile che sia in qualche modo coinvolta nell'AD (Marambaud et al., 2003)(Vitolo et al., 2002)(S. H. Francis, Busch, Corbin, & Sibley, 2010)(Y. Chen et al., 2012)(Nishimoto et al., 1993)(Müller, Cárdenas, Mei, Cheung, & Foskett, 2011)(Teich et al., 2015)(Y.-S. Hu, Long, Pigino, Brady, & Lazarov, 2013)(Bartolotti, Bennett, & Lazarov, 2016)(Pugazhenthii, Wang, Pham, Sze, & Eckman, 2011)(Yamamoto-Sasaki, Ozawa, Saito, Rösler, & Riederer, 1999)(Yamamoto et al., 1997). CREB è un crocevia nel percorso di diverse molecole e nei meccanismi che sono stati proposti come potenziali bersagli terapeutici per l'AD, compreso il pathway dell'ossido nitrico (NO)/guanilato ciclasi/guanosina ciclica protein chinasi (PKG)/CREB, quello dell'adenilil ciclasi/protein chinasi cAMP-dipendente (PKA)/CREB e quello del mitogeno attivatore della protein chinasi/ERK (MAPK/ERK) (Teich et al., 2015). A

questo proposito, la cascata NO/guanilato ciclastasi/PKG/CREB è particolarmente attraente perché i farmaci che la stimolano, in particolare l'inibitore della fosfodiesterasi 5 (PDE5), sono ampiamente usati per la terapia della disfunzione erettile e ipertensione polmonare (Francis et al., 2010), ed è quindi plausibile che la loro somministrazione possa essere compatibile con l'uso terapeutico.

NO, una molecola gassosa prodotta dall'enzima NO-sintasi, è coinvolta in diverse fasi della fisiologia cerebrale, dallo sviluppo alla plasticità sinaptica alla memoria (Arancio et al., 1996)(Böhme, Bon, Stutzmann, Doble, & Blanchard, 1991)(Bon & Garthwaite, 2003). NO attiva la guanil ciclastasi solubile (sGC) che, a sua volta, produce cGMP (Boulton, Southam, & Garthwaite, 1995), un nucleotide ciclico i cui livelli sono anche sottoregolati da PDE5, un enzima che idrolizza specificamente il nucleotide. Seguendo la sua produzione, cGMP attiva PKG, una famiglia di chinasi che sono state implicate nella modulazione della neurotrasmissione, nell'LTP e nella memoria (Boulton et al., 1995)(Prickaerts, de Vente, Honig, Steinbusch, & Blokland, 2002)(Paakkari & Lindsberg, 1995)(Baratti & Boccia, 1999), e sono in grado di fosforilare CREB. La proteomica e gli studi metabolomici hanno rivelato un'omeostasi dell'NO alterata nell'AD (Hannibal, 2016). Inoltre, l'up-regulation della cascata di NO attraverso farmaci che agiscono su diversi componenti molecolari hanno fornito risultati molto promettenti in quegli studi volti a trovare strategie per contrastare il danno della plasticità sinaptica e della memoria dagli oligomeri di A β (Puzzo et al., 2005)(Fiorito et al., 2013), un'altra proteina tossica nell'AD.

Dato che, gli oligomeri di A β deteriorano memoria e LTP nei topi (Puzzo et al., 2017) e condividono un meccanismo molecolare comune, abbiamo studiato se il danno indotto da τ sulla funzione sinaptica e sulla memoria può essere salvato tramite upregolazione dei vari elementi della cascata di NO.

2.2.1 La biologia della memoria: il ruolo di CREB e dei nucleotidi ciclici

La caratteristica più rilevante del sistema nervoso è la sua capacità di percepire e adattarsi ai cambiamenti ambientali. Gli stimoli esterni sono in grado di indurre effetti drastici e di

lunga durata nel cervello regolando la funzione, la generazione, la differenziazione, la sopravvivenza o la morte dei neuroni. Questi processi cellulari indotti da stimoli ambientali si verificano principalmente attraverso un programma genetico complesso che garantisce cambiamenti appropriati nell'espressione genica. I meccanismi alla base di questi programmi di trascrizione, dipendenti dall'attività correlata alla funzione neuronale e alla plasticità, sono stati oggetto di indagini negli ultimi 20 anni e hanno portato all'individuazione di fattori di trascrizione regolati dall'attività neuronale (Z. Qiu & Ghosh, 2008). I fattori di trascrizione sono fondamentali per orchestrare specifici programmi di espressione genica o reti di geni che facilitino il corretto sviluppo e la funzione del cervello. Oltre alla trascrizione, allo splicing e alla traduzione dell'mRNA, altri meccanismi, come la regolazione epigenetica, microRNA e traduzione locale, stanno ora emergendo come meccanismi fondamentali che regolano le risposte trascrizionali cognitive (Riccio, 2010)(Sweatt, 2010).

Il neuroscienziato spagnolo Santiago Ramón y Cajal è stato il primo a proporre che le cellule nervose siano cellule polarizzate del sistema nervoso e che ricevono impulsi di corrente che permettono la trasmissione di informazioni dai terminali assonali ai dendriti e ai corpi cellulari e possono trasmettere informazioni a grandi distanze tramite gli assoni stessi. Originariamente Cajal ipotizzò il potenziale del cervello di adattarsi all'ambiente attraverso il rinforzo di connessioni preesistenti e cambiamenti strutturali che migliorerebbero l'efficienza dei circuiti neuronali (Jones, 1994). Cajal ha affermato che l'aumento della forza delle connessioni neuronali indotte da uno stimolo potrebbe essere coinvolto nei processi mentali e di memoria (DeFelipe, 2006). La visione moderna di Cajal postula che la forza delle connessioni sinaptiche o dei cambiamenti di plasticità che persistono per giorni o molto di più, a seguito della formazione e dell'apprendimento, induce la formazione della memoria. Il rinforzo dipendente dalle attività e il raffinamento delle connessioni sinaptiche si verificano durante lo sviluppo e nel cervello adulto. Questi cambiamenti di efficacia sinaptica sono mediati da cambiamenti strutturali di lunga durata alle sinapsi, che richiedono l'attivazione di specifici programmi di espressione genica. Il concetto di espressione genica come meccanismo che regola lo sviluppo e la funzione del sistema nervoso è stato inizialmente proposto negli anni '80. Studi pionieristici hanno dimostrato che i fattori di crescita e i neurotrasmettitori, come il

fattore di crescita delle cellule nervose e l'acetilcolina, hanno migliorato la trascrizione dei geni precoci nei neuroni attraverso un meccanismo che richiede infusione di calcio (Greenberg, Ziff, & Greene, 1986). Allo stesso modo, è stato dimostrato che l'espressione della somatostatina dipende dai livelli ciclici di adenosina 3',5' -monofosfato (cAMP) attraverso un elemento responsivo alla cAMP (CRE) situato a monte del sito di inizio della trascrizione (Montminy, Sevarino, Wagner, Mandel, & Goodman, 1986). La proteina nucleare che si lega selettivamente alla regione CRE del gene della somatostatina è identificata come proteina di legame dell'elemento cAMP (CRE) del fattore di trascrizione (CREB). Studi condotti negli ultimi due decenni hanno dimostrato che il fattore di trascrizione CREB attiva l'espressione di centinaia di geni in risposta a un gran numero di stimoli extracellulari (Lonze & Ginty, 2002). La trascrizione mediata da CREB è un meccanismo comune che media forme durature di plasticità sinaptica nell'ippocampo dei mammiferi, una regione del cervello essenziale per la codifica e l'archiviazione della memoria. CREB svolge un ruolo essenziale nella facilitazione della memoria a breve termine e nella memoria a lungo termine nell'ippocampo (Silva, Kogan, Frankland, & Kida, 1998). Durante questo processo, il coattivatore di CREB, CREB binding protein (CBP) e il coattivatore di trascrizione regolato dal CREB (CRTC) possono agire come regolatori chiave nei programmi di trascrizione genica mediando tipi specifici di memoria.

La base cellulare della memoria.

Il cervello è un organo unico, evolutivamente progettato per percepire il suo ambiente interno e quello esterno, per percepire le relazioni causali tra gli stimoli e per modificare la sua risposta in modo adattativo. Per realizzare questo incredibile compito, una rete autoregolante di 40.000 geni dirige lo sviluppo di una rete cellulare di cento miliardi di neuroni con sette miliardi di connessioni tra di loro. Per raggiungere tale complessità sconcertante, l'attività computazionale generata da questa rete neurale si nutre continuamente della rete genetica sottostante regolando l'espressione dei geni della "plasticità", che alterano quindi la connettività neurale (sinaptica). Questi cambiamenti sinaptici, distribuiti attraverso il circuito neurale attivato dall'esperienza, sono considerati la base fisica della LTM (Bruce, 2001). Gli studi sugli animali hanno rivelato come

questo processo emerga fin dallo sviluppo. I meccanismi indipendenti dall'attività controllano innanzitutto la differenziazione dei diversi tipi di cellule nel sistema nervoso centrale (SNC) e la formazione iniziale dei processi neuronali. Questi passaggi si traducono in modelli di connessioni sinaptiche ampiamente stereotipati, sebbene spesso grezzi. Quindi, i meccanismi dipendenti dall'attività promuovono lo sharpening e il perfezionamento di questi circuiti mentre le sinapsi maturano. Le intuizioni fisiologiche sono emerse dai modelli cellulari di plasticità sinaptica. La riorganizzazione sinaptica continua all'interno del cervello adulto, a sostegno della nozione che la plasticità comportamentale e la plasticità dello sviluppo potrebbero essere diverse manifestazioni di un medesimo meccanismo molecolare che viene conservato nella plasticità sinaptica (Weeber & Sweatt, 2002).

Le basi biochimiche della memoria: la proteina CREB.

Studi molecolari hanno indagato sulla biochimica che è alla base della plasticità cercando di collegare vari aspetti della plasticità sinaptica (LTP) con la plasticità comportamentale. Le esatte entità biochimiche che partecipano alla segnalazione inter- e intracellulare, che alla fine producono cambiamenti nella struttura e nella funzione delle sinapsi, sono numerose e sono ancora in fase di scoperta. Ad oggi, tuttavia, alcuni aspetti chiave del processo sono ben consolidati. Innanzitutto, l'attivazione del recettore NMDA (N-metil-D-aspartato) (nei mammiferi) sembra essere centrale nella risposta biochimica transitoria locale della sinapsi. Secondo, con schemi appropriati di attività neurale (che spesso richiedono ripetizione e riposo (Impey et al., 1996), queste risposte biochimiche transitorie inducono cambiamenti nell'espressione genica nel nucleo cellulare tramite attivazione (cioè fosforilazione) del fattore di trascrizione CREB (Bartsch et al., 1995)(Alberini, Ghirardi, Metz, & Kandel, 1994)(Taubenfeld et al., 2001)(Mizuno et al., 2002). Questa risposta trascrizionale dipende anche dall'attivazione del recettore NMDA (Shaywitz & Greenberg, 1999)(Cammarota et al., 2000). Terzo, sebbene molte chinasi possano partecipare ai cambiamenti biochimici sinaptici locali, la proteina chinasi A (PKA) (chinasi ciclica dipendente dall'AMP) e le vie di segnalazione della chinasi della proteina mitogenata (MAP) svolgerebbero ruoli dominanti nell'attivazione di CREB (Xing, Ginty, & Greenberg, 1996)(Martin, Michael, et al., 1997)(Impey et al., 1998). In

quarto luogo, CREB regola una cascata di fattori di trascrizione coinvolta in un processo di crescita che produce cambiamenti strutturali specifici della sinapsi (Frey & Morris, 1997)(Martin, Casadio, et al., 1997)(Frey & Morris, n.d.)(Casadio et al., 1999). Questo processo sembra implicare il trasporto di microtubuli di mRNA nascenti nelle regioni sinaptiche e la regolazione locale della traduzione (Dubnau et al., 2003).

Un interruttore molecolare per LTM.

Studi neurogenetici hanno dimostrato che CREB è un punto di controllo chiave per la formazione della LTM (Tully, 1997). Le mutazioni che interessano la perdita di funzione di CREB lasciano l'apprendimento e la STM intatti, ma compromettono la LTM (Yin et al., 1994)(Bourtchuladze et al., 1994)(Lamprecht, Hazvi, & Dudai, 1997)(J F Guzowski & McGaugh, 1997)(Pittenger et al., 2002)(Kida et al., 2002). Anche le mutazioni con guadagno di funzione lasciano intatto l'apprendimento e la STM, ma migliorano la formazione della LTM in particolare riducendo la quantità di allenamento richiesta per produrre il massimo della LTM (Yin, Del Vecchio, Zhou, & Tully, 1995)(Josselyn et al., 2001). Manipolazioni simili di CREB, inoltre, producono anche cambiamenti concomitanti nella struttura e nelle funzioni sinaptiche sottostanti in diversi modelli animali e in varie regioni del cervello dei mammiferi (Dash, Hochner, & Kandel, 1990)(Barco, Alarcon, & Kandel, 2002)(Davis, Schuster, & Goodman, 1996)(Sanyal, Sandstrom, Hoeffler, & Ramaswami, 2002)(Ahn, Ginty, & Linden, 1999)(Barth et al., 2000)(Pham, Rubenstein, Silva, Storm, & Stryker, 2001). L'osservazione che opposte manipolazioni genetiche producono effetti opposti sulla LTM indicano che CREB funziona come un "interruttore molecolare" limitante la velocità nel suo percorso biochimico. L'utilizzo di farmaci agonisti e antagonisti sono l'equivalente chimico delle manipolazioni genetiche di guadagno e di perdita di funzione. Da questa prospettiva biologica, quindi, gli obiettivi molecolari ideali per la scoperta dei farmaci sono quelli che agiscono come interruttori molecolari. Più in generale, questi studi neurobiologici indicano chiaramente che molti geni sono coinvolti in ciascuno dei diversi stadi funzionalmente distinti della formazione della memoria. È probabile che molti di questi geni agiscano come interruttori molecolari e possano essere potenziali bersagli per lo screening dei farmaci. In definitiva, questi diversi farmaci potrebbero offrire l'opportunità

di adattare terapie specifiche a specifici aspetti della perdita di memoria, e particolari combinazioni di farmaci che modulano fasi separate della formazione della memoria potrebbero fornire trattamenti più efficaci.

2.2.1.2 Nucleotidi ciclici

I nucleotidi ciclici (cAMP e cGMP) sono molecole, dette anche segnali intracellulari, che regolano una miriade di processi nel sistema nervoso centrale (CNS), tra cui la neurogenesi, la costruzione di complessi circuiti neuronali, l'apoptosi, la plasticità sinaptica, il sonno, il gating sensomotorio, la stabilità dell'umore, la memoria e altre funzioni cognitive (Kaplan, Kent, Charron, & Fournier, 2014)(Averaimo & Nicol, 2014)(Nicol & Gaspar, 2014)(Heckman, Blokland, Ramaekers, & Prickaerts, 2015). L'invecchiamento, l'età e le malattie, compreso il morbo di Alzheimer, la malattia di Huntington (HD) e malattia di Parkinson (PD), sono associati a deficit in molti, se non in tutti, questi processi (Apple, Solano-Fonseca, & Kokovay, 2017), e ciò suggerisce che la normale funzione dei nucleotidi ciclici possa essere compromessa in questi pazienti.

Entrambe i percorsi in cui sono implicati il cAMP e il cGMP sono composti da numerose molecole responsabili della sintesi, esecuzione e scomposizione dei loro segnali (Fig. 1).

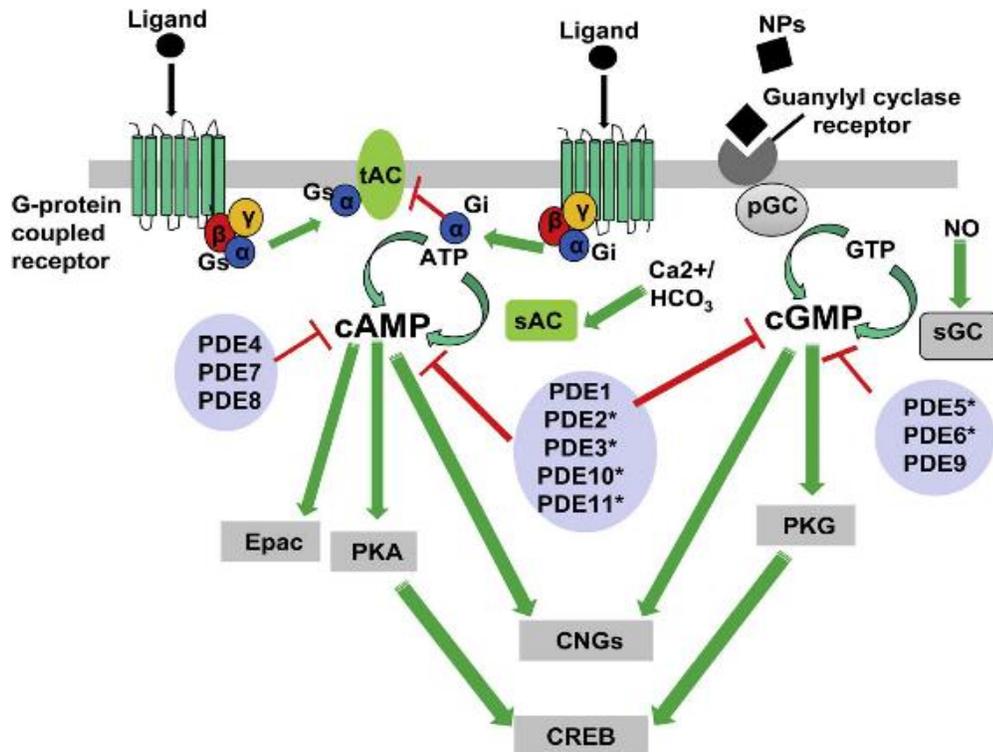


Figura 1. Le cascate di segnalazione responsabili della sintesi, esecuzione e rottura dei segnali cAMP e cGMP. I recettori accoppiati alle proteine G attivano le proteine G eterotrimeriche contenenti un inibitore (Gi) o attivata' (Gs) della subunità alfa (facilitando lo spostamento di un limite PIL per GTP) che agiscono sulla adenil ciclasi transmembrana (TAC). Al contrario, si attivano calcio e bicarbonato (HCO_3^-) AC solubile (CAA). Le ACs sintetizzano la formazione del 3',5'-ciclico monofosfato di adenosina (cAMP) dall' ATP. cAMP può quindi attivare la proteina di scambio attivata da cAMP (Epac), la protein chinasi A (PKA) o CNG. I peptidi natriuretici (NP) attivano recettori particolari quali le guanilil ciclasi (pGC), e l'ossido di azoto (NO) stimola il GC solubile (sGC). Il GC sintetizza la formazione di 3',5'-ciclico guanosina monofosfato (cGMP) dal GTP. Il cGMP attiva la protein chinasi G (PKG) e il CNG. L'attivazione di PKA e/o PKG porta alla fosforilazione e attivazione del fattore di trascrizione CREB (proteina di legame dell'elemento di risposta del cAMP). 11 sono le famiglie di 3',5'-nucleotidi fosfodiesterasi nucleotidiche (PDE) che idrolizzano il cAMP e/o cGMP e l'attività di selezione delle PDE (indicate con *) sono regolate allostericamente dal cAMP o cGMP in modo da ottenere la massima efficacia con effetti collaterali minimi.

È noto da tempo che il cAMP è sintetizzato nel cervello dalla adenilil ciclasi (AC) una proteina transmembrana, che è attivata dal $\text{Gs}\alpha$ e inibita dal $\text{Gi}\alpha$ (Neves, Ram, & Iyengar, 2002). Più recentemente, tuttavia è stato dimostrato che il cAMP è anche sintetizzato nel cervello da AC solubili, che sono espresse nella glia e nei neuroni dei mammiferi e sono attivate da bicarbonato e calcio (J. Chen, Martinez, Milner, Buck, & Levin, 2013). Il cGMP è sintetizzato dalle ciclasi guanilil partolocate (pGC), che sono attivate dai peptidi natriuretici, e dalle ciclasi guaniliche solubili (sGC), che sono attivate dall'ossido nitrico (NO) (Gorczyca, Kobińska, Kuropatwa, & Kurowska, 2003). Il cAMP attiva la protein chinasi A (PKA), la proteina attivata dal cAMP (Epac) e i canali di gating dei nucleotidi

ciclici; mentre, il cGMP attiva la protein chinasi G (PKG) e i nucleotidi ciclici controllati dai canali. L'attivazione dei percorsi del cAMP o del cGMP può infine portare all'attivazione (cioè alla fosforilazione) di CREB per facilitare la trascrizione dei geni dipendenti dalla proteina CRE. cAMP e cGMP sono degradati da 11 famiglie di fosfodiesterasi (PDE), alcune delle quali sono modulate allostericamente dagli stessi cAMP e cGMP (S. H. Francis et al., 2010).

Alterazioni nella segnalazione dei nucleotidi ciclici associati all'invecchiamento

Gli studi mostrano risultati contrastanti per quanto riguarda l'effetto dell'età sulla sintesi del cAMP. Riduzioni nell'attività basale e in quelle G α s-stimolate sono correlate all'aumento dell'età nei campioni di cervello umano (regione non specificata) (Cowburn, O'Neill, Ravid, Winblad, & Fowler, 1992). Sfortunatamente, gli studi sugli animali sono altamente contrastanti per quanto riguarda le segnalazioni di cambiamenti legati all'età nell'attività della AC. In diverse regioni del cervello (ippocampo, corteccia, striato e cervelletto), alcuni studi condotti su animali hanno mostrato una netta riduzione legata all'età nell'attività della AC mentre altri studi non hanno mostrato alcun cambiamento (Hara, Onodera, Kato, & Kogure, 1992)(Sugawa & May, 1994)(Puri & Volicer, 1981)(Araki, Kato, Fujiwara, & Itoyama, 1995).

I cambiamenti nei livelli di cAMP correlati all'età nel tessuto umano sono anch'essi confusi e quelli nel cervello dei roditori sono in qualche modo in conflitto, ma emergono alcune tendenze generali. Nell'uomo e nei roditori, i livelli basali di cAMP sono diminuiti nei globuli bianchi dei giovani adulti, rispetto agli anziani (Birkenfeld & Ben-Zvi, 1984)(Fulop, Kekessy, & Foris, 1990). I livelli di cAMP sono ridotti nel siero in correlazione all'età rispetto ai giovani roditori adulti (R. Hu et al., 2007), ma i livelli sono invariati nei microvasi umani cerebrali degli individui anziani (Grammas, Roher, & Ball, n.d.)(Martínez, Hernández, & Hernanz, 2001). I livelli basali di cAMP non sembrano cambiare con l'età nell'ippocampo dei roditori (Hara et al., 1992)(Puri & Volicer, 1981)(Titus, Furones, Kang, & Atkins, 2013); tuttavia, nel danno traumatico cerebrale (TBI) i livelli del cAMP dell'ippocampo dei roditori anziani o dei giovani adulti sono significativamente ridotti (Titus et al., 2013). Allo stesso modo, i livelli basali di cAMP non sembrano differire tra adulti e giovani adulti nel cervelletto dei roditori (Hara et al.,

1992)(Puri & Volicer, 1981); tuttavia, norepinefrina e i livelli di cAMP stimolati dal kainato sembrano essere significativamente diminuiti nel cervelletto dei roditori anziani (Schmidt & Thornberry, 1978). Al contrario, i livelli basali del cAMP sono diminuiti nella corteccia dei roditori invecchiati (Titus et al., 2013)(Schmidt & Thornberry, 1978)(Hara et al., 1992)(Puri & Volicer, 1981)(Zimmerman & Berg, 1974)(Berg & Zimmerman, n.d.), così come i livelli basali di cAMP nel talamo e/o nell'ipotalamo (Titus et al., 2013)(Schmidt & Thornberry, 1978)(Puri & Volicer, 1981). L'iniezione di un analogo del cAMP nella corteccia prefrontale mima i deficit legati all'età nella memoria del lavoro; mentre l'infusione di un bloccante del cAMP inverte i deficit legati all'età nella memoria del lavoro e corrispondenti endpoint neurofisiologici (Ramos et al., 2003)(M. Wang et al., 2011)(Vandesquille et al., 2013).

L'attività della PKA non è sempre ridotta con l'invecchiamento, tuttavia, un'aumento dell'attività della PKA è stato notato nei microvasi nel cervello dei roditori anziani o giovani adulti (Cashman & Grammas, 1995). Quindi, l'effetto dell'invecchiamento sul segnale cAMP sembra essere specifico per regioni determinate del cervello.

Altri studi hanno esaminato i potenziali cambiamenti legati all'età nel percorso NOS-sGC che potrebbero contribuire alle alterazioni della sintesi del cGMP. I risultati sono altamente contraddittori in quanto i cambiamenti nell'attività della NOS sono strettamente legati all'età. Blum-Degen e colleghi non hanno trovato alcuna differenza nell'attività della NOS nella corteccia parietale umana invecchiata vs quella di soggetti giovani, come anche nel nucleo accumbens o nel cervelletto (Blum-Degen et al., 1999). Nella letteratura animale, tuttavia, ci sono diversi risultati che segnalano l'aumento, la diminuzione o nessun cambiamento nell'attività della NOS nell'età avanzata vs ippocampo, cervelletto e corteccia dei giovani adulti, senza rilevanti differenze per spiegare e giustificare risultati così discrepanti (Chalimoniuk & Strosznajder, n.d.)(P Liu, Smith, Appleton, Darlington, & Bilkey, 2004)(P Liu, Smith, Appleton, Darlington, & Bilkey, 2003)(Ping Liu, Smith, Appleton, Darlington, & Bilkey, 2005). I rapporti tra le specie sono più coerenti per quanto riguarda i cambiamenti legati all'età nell'espressione delle GC e/o dell'attività. L'espressione della sGC diminuisce tra i 60 e i 90 anni di età nella corteccia frontale umana, prefrontale, parietale e orbitale nel nucleo accumbens (Ibarra, Nedvetsky,

Gerlach, Riederer, & Schmidt, 2001); inoltre l'attività della GC è ridotta in età avanzata rispetto ai roditori adulti nell'ippocampo e nel cervelletto (Chalimoniuk & Strosznajder, n.d.). Insieme, questi studi suggeriscono che l'invecchiamento può essere associato a una ridotta sintesi di cGMP nel cervello.

I livelli del cGMP sono aumentati nei globuli bianchi prelevati in soggetti avanti con l'età rispetto ai giovani adulti (Fulop et al., 1990) e anche nel siero da roditori anziani o da giovani adulti (R. Hu et al., 2007). Al contrario, tuttavia, i livelli di cGMP sono ridotti nelle piastrine delle persone anziane o giovani adulti (Kawamoto et al., 2005). Nell'età avanzata i livelli del cGMP nel cervello umano sono fortemente diminuiti, mentre negli studi sui roditori hanno identificato una diminuzione dei livelli del cGMP nei cervelli anziani rispetto ai giovani adulti (Puri & Volicer, 1981)(Schmidt & Thornberry, 1978)(Chalimoniuk & Strosznajder, n.d.)(Scavone et al., 2005) anche nell'ippocampo, ma non nella corteccia (Chalimoniuk & Strosznajder, n.d.). Anche l'accumulo del cGMP stimolato dal glutammato è gravemente compromesso nell'ippocampo dei giovani roditori adulti e nel cervelletto (Piedrafita, Cauli, Montoliu, & Felipo, 2007). Coerente con una riduzione dei livelli di cGMP, l'attività della PKG è diminuita anche nel cervelletto di ratto anziano rispetto al giovane (Scavone et al., 2005). Inoltre, gli inibitori della PDE2 (Domek-Łopacińska & Strosznajder, 2008), PDE3 (Yanai, Toyohara, Ishiwata, Ito, & Endo, 2017) e PDE5 migliorano i deficit correlati con l'età nei valori di pCREB, LTP e/o nella memoria nei roditori (Palmeri, Privitera, Giunta, Loreto, & Puzzo, 2013)(Orejana, Barros-Miñones, Jordán, Puerta, & Aguirre, 2012)(Devan et al., 2014). Pertanto, l'aumento della segnalazione di cGMP può anche rivelarsi una buona strategia percorribile per il trattamento del declino cognitivo legato all'età.

La stragrande maggioranza degli studi sull'età che esaminano la segnalazione della proteina CREB sono concentrati sull'ippocampo, con alcuni studi incentrati anche su specifici sottoregioni della corteccia. Negli esseri umani, i livelli di CREB nell'ippocampo sono diminuiti con l'aumentare dell'età (Yamamoto-Sasaki et al., 1999). Nei roditori, numerosi studi riportano una significativa diminuzione della fosforilazione basale e/o indotta dall'addestramento di CREB (pCREB) nell'ippocampo di roditori anziani o giovani adulti (Dagnas, Guillou, Prévôt, & Mons, 2013)(Porte, Buhot, & Mons, 2008), con solo uno studio che suggerisce che questa riduzione del pCREB legata all'età

sia limitata ai soggetti con problemi cognitivi. Inoltre, la sovraespressione di CREB nei roditori in particolare nella parte CA1 dell'ippocampo è sufficiente per il salvataggio della memoria legata all'età e dei deficit neurofisiologici (X.-W. Yu, Curlik, Oh, Yin, & Disterhoft, 2017). Nella corteccia dei roditori giovani e adulti, pCREB sembra essere diminuita nelle regioni parietali, (Titus et al., 2013) ma comunque aumentata nelle regioni prefrontali (Ramos et al., 2003)(Vandesquille et al., 2013). Questi dati suggeriscono che cambiamenti specifici in determinate regioni cerebrali dei nucleotidi ciclici accompagnano l'invecchiamento, con diminuzioni di questi nell'ippocampo e in alcune regioni corticali, ma aumento in modo specifico nella corteccia prefrontale.

Alterazioni nella segnalazione del nucleotide ciclico associate a Malattia di Alzheimer, lieve deterioramento cognitivo (MCI), e demenza

Studi sui pazienti, modelli animali e modelli *in vitro* suggeriscono che le alterazioni specifiche di determinate regioni del cervello nella segnalazione di cAMP possano contribuire alla patologia correlata alla demenza. L'attività delle AC stimolata dalle $G\alpha$ sembra essere ridotta nell'ippocampo (O'Neill et al., 1994)(Schnecko, Witte, Bohl, Ohm, & Lemmer, 1994)(Ohm, Bohl, & Lemmer, 1989)(Ohm, Bohl, & Lemmer, 1991), nella corteccia temporale (Cowburn et al., 1992)(Bonkale et al., 1996), nella corteccia frontale (Cowburn et al., 1992), nella corteccia occipitale (Cowburn et al., 1992) e nel cervelletto (Bonkale et al., 1996)(Schnecko et al., 1994) dei pazienti con AD o una forma più lieve di demenza rispetto ai controlli. Il rapporto tra l'attività basale delle AC e quelle stimulate dalla forskolina nei pazienti è alquanto contraddittorio.

Studi *in vitro* e sui roditori dimostrano che la sovraespressione di BACE1 (β - enzima di scissione della proteina precursore dell'amiloide 1) o l'infusione di $A\beta$ 1-42 sono sufficienti per ridurre i livelli di cAMP nei lisati del cervello (Schnecko et al., 1994) e nell'ippocampo. In una linea separata di studi, riduzioni significative del legame del cAMP sono state misurate nella frazione citosolica, ma non nella frazione particellare, della corteccia entorinale e del subiculo prelevato da pazienti con AD e con gravi depositi di amiloide (Bonkale, Cowburn, Ohm, Bogdanovic, & Fastbom, 1999). Un'analoga tendenza verso valori ridotti di cAMP e' stata osservata anche nelle frazioni citosoliche ippocampali dei pazienti con AD e severa deposizione di amiloide (Bonkale et al., 1999).

Studi sia su pazienti con AD, che su modelli di roditori, che in modelli *in vitro* riportano anche una ridotta espressione e/o attività della PKA (Y. Chen et al., 2012)(Kim, Nairn, Cairns, & Lubec, 2001)(Liang, Liu, Grundke-Iqbal, Iqbal, & Gong, 2007)(Du et al., 2014)(Vitolo et al., 2002)(Shi et al., 2011). Soprattutto, è da notare come i deficit ippocampali siano invertiti nei modelli di AD quando i livelli di cAMP sono aumentati sia perchè stimolati da attività delle AC con forskolina (Q.-W. Wang, Rowan, & Anwyl, 2009) o, come discusso di seguito, dalla riduzione dell'espressione e/o dell'attività di cAMP-PDE (Puzzo et al., 2005)(Gong et al., 2004)(Annerieke S R Sierksma et al., 2013)(A S R Sierksma et al., 2014). Inoltre, la capacità degli agenti che aumentano la concentrazione del cAMP e che quindi sono in grado di invertire/prevenire il deficit da parte della A β 1-42 nell'ippocampo richiede la PKA (Vitolo et al., 2002)(Q.-W. Wang et al., 2009). Insieme, questi studi suggeriscono fortemente che la riduzione della segnalazione del cAMP a causa della PKA sia una caratteristica chiave della patologia AD.

Anche aumenti localizzati del cAMP possono contribuire alla patologia dell'AD. I livelli aumentati di cAMP sono stati misurati nei vasi cerebrali dei pazienti affetti da AD e nei controlli sani (Grammas et al., n.d.)(Martínez et al., 2001). Sebbene 2 studi non abbiano trovato differenze sostanziali nei livelli di cAMP nel CSF dei pazienti affetti da AD paragonati ai controlli (Ugarte et al., 2015)(Hesse et al., 2017), un altro studio ne ha invece rilevato elevati livelli nei pazienti AD (Martínez et al., 1999). È interessante notare che i livelli elevati di cAMP nel CSF, trovati nell'ultimo studio, siano correlati con i livelli di proteina tau (Martínez et al., 1999). La PKA è strettamente associata a NFT (Jicha et al., 1999) ed è noto iperfosforilare la proteina Tau, in particolare nei residui S198, S199, S214 e S409 (Jicha et al., 1999)(Robertson et al., n.d.). Inoltre, Tau-pS214 e Tau-pS409 si trovano solo nel tessuto dei pazienti AD (Jicha et al., 1999). Un tale meccanismo localizzato potrebbe spiegare perché studi hanno dimostrato che basse dosi, ma non alte dosi, di inibitori della PKA sono in grado di migliorare la gravità della patologia (Eftekharzadeh et al., 2012)(Amini et al., 2015)(Ueda, Yagami, Kageyama, & Kawasaki, 1996), nonostante il fatto che l'attività della PKA globale è ampiamente ridotta nei pazienti con AD e nei modelli animali (Y. Chen et al., 2012)(Kim et al.,

2001)(Vitolo et al., 2002) e che meccanismi che aumentano la via di segnalazione cAMP/PKA/CREB sembrano prevenire e/o invertire alcuni dei deficit relativi alla patologia (Du et al., 2014)(Vitolo et al., 2002)(Q.-W. Wang et al., 2009)(A S R Sierksma et al., 2014)(Tai, Chien, Chang, & Yang, 2017)(Maki et al., 2014)(Cameron, Whiteley, Day, Parachikova, & Baillie, 2017) (Bate & Williams, 2015). Detto questo, la fosforilazione da parte della PKA da parte di tau non sempre promuove i NFT. Ad esempio, se PKA fosforila tau sul residuo S214 dopo che la glicogeno sintasi chinasi-3 β (GSK-3 β) ha fosforilato il residuo Thr214 si formerebbero i filamenti elicoidali accoppiati (PHF); tuttavia, se PKA fosforila S214 prima delle fosforilazioni GSK-3 β sul residuo Thr214 pTau non forma i PHF (Zheng-Fischhöfer et al., 1998). In effetti, è la fosforilazione della PKA su tau che riduce o aumenta la sua affinità per i microtubuli e ne determina anche il suo assemblaggio nei PHF (Schneider, Biernat, von Bergen, Mandelkow, & Mandelkow, 1999), forse perché precedente la fosforilazione di tau da parte della PKA renderebbe alcuni siti di tau meno accessibili ad altre chinasi (Raghunandan & Ingram, 1995).

Oltre alle riduzioni nella sintesi del cAMP, potrebbero esserci anche altre alterazioni associate all'AD nella degradazione del cAMP dovute a specifiche famiglie di PDE. È stata osservata una maggiore espressione della PDE3 presente nella microcircolazione cerebrale (Maki et al., 2014). La presenza dell'A β 1-42 solubile e fibrillare aumenta l'espressione della PDE4B nella microglia in coltura, portando all'aumento della neuroinfiammazione (Sebastiani et al., 2006). Nei pazienti con AD nello stadio iniziale sono aumentati gli mRNA della PDE4B e l'mRNA della PDE4A nella corteccia entorinale; tuttavia, l'espressione dell'mRNA della PDE4A è ridotta nella corteccia frontale e nella CA2 di pazienti con AD in stadio avanzato. L'mRNA PDE4D1 è stato trovato con valori raddoppiati nell'ippocampo di un paziente AD, mentre PDE4D2 e PDE4D3 rimangono immutati e PDE4D5-9 sono drasticamente ridotti (McLachlan et al., 2007). L'espressione dell'mRNA di PDE4D è stato trovato aumentato nel putamen dei pazienti con AD, ma riportato come immutato nella corteccia temporale nei pazienti AD (Ugarte et al., 2015). L'mRNA del PDE7A è ridotto nel giro dentato (DG) dell'ippocampo, mentre l'espressione della PDE8B è aumentata nel DG e nel CA2

dell'ippocampo (Pérez-Torres et al., 2003). Nessun cambiamento nell'espressione è stato notato per il PDE10A nella corteccia temporale (Ugarte et al., 2015) o nella PDE2A specifica per la corteccia, l'ippocampo, lo striato o il cervelletto dei pazienti con AD (Reyes-Irisarri, Sánchez, García-Merino, & Mengod, 2007). Pertanto, i cambiamenti associati all'AD nell'espressione/attività delle PDE sono chiaramente imputabili alle isoforme e alle regioni specifiche del cervello. Sebbene non tutti gli studi identifichino una sovraregolazione dell'espressione o dell'attività della cAMP-PDE nei pazienti con AD, gli inibitori della PDE hanno dimostrato l'efficacia nei modelli umani e animali.

Anche nell'attività dell'enzima NOS sono state riscontrate numerose differenze tra soggetti malati e controlli sani. Infatti rispetto ai controlli sani nei pazienti affetti da AD sono stati riscontrati ridotti valori dell'espressione dell'inibitore della NOS endogeno nel CSF (Abe, Tohgi, Murata, Isobe, & Sato, 2001) ed è stato riscontrato una maggiore attività della NOS nelle piastrine di pazienti con AD (Kawamoto et al., 2005). L'aumentata espressione della NOS è stata anche riscontrata nell'ippocampo dei pazienti con AD (Yew, Wong, Li, Lai, & Yu, 1999) così come nella microglia e nei monociti trattati con A β 1-40 (Combs, Karlo, Kao, & Landreth, 2001). L'aumentata attività della NOS fornirebbe una quantità di NO aggiuntiva che potrebbe attivare le sGC. Questi aumenti nella via di segnalazione della NOS possono essere indicati come un compenso in risposta al cambiamento della ridotta espressione e/o attività delle sGC. In effetti, la ridotta attività delle sGC, ma non del pGC, è stata notata in maggior misura nella corteccia temporale dei pazienti con AD (Bonkale, Winblad, Ravid, & Cowburn, 1995) e una diminuzione dell'attività e/o espressione delle sGC è stata osservata negli astrociti reattivi dei pazienti con AD (Baltrons, Pedraza, Heneka, & García, 2002) e negli astrociti coltivati trattati con A β 1-40 o A β 25-35 (Duszczuk, Kuszczuk, Guridi, Lazarewicz, & Sadowski, 2012).

Coerente con l'idea che l'AD sia associato a una diminuzione nella via di segnalazione dei livelli di sGC, i livelli del cGMP sono significativamente ridotti nel liquido cerebrospinale dei pazienti affetti da AD in confronto ai controlli; i livelli inferiori del cGMP nel CSF sono significativamente correlati a un peggioramento delle prestazioni

all'esame mini mental state (MMSE) (Ugarte et al., 2015). Anche i livelli di cGMP sono ridotti nelle piastrine nei pazienti con AD (Kawamoto et al., 2005). Modelli di topo AD non mostrano una sovraregolazione dei livelli di cGMP dopo l'attivazione del recettore NMDA nell'ippocampo (Duszczyk et al., 2012), e le sezioni ippocampali non mostrano un'upregulation del cGMP indotta dall'LTP quando l'animale è trattato con A β 1-42 (Puzzo et al., 2005). È importante sottolineare che, trattamenti che elevano i livelli del cGMP migliorano l'infiammazione microgliale (Paris et al., 1999), i livelli del glutammato sinaptosomiale e il deficit del trasporto del glucosio (Mattson, 1997), la citotossicità (Wirtz-Brugger & Giovanni, 2000) e il deficit dell'LTP causati dall'infusione di A β (Puzzo et al., 2005) o che si trovano nei sinaptosomi dei pazienti con AD (Prieto et al., 2017). Presi insieme, questi studi valorizzano fortemente come causa il deterioramento dell'asse sGC/cGMP/PKG nell'AD.

Oltre a ridurre la sintesi del cGMP tramite l'azione delle sGC, l'AD può essere anche associato a una maggiore degradazione del cGMP da parte dei cGMP-PDE. Un aumento di ben 5 volte dell'espressione della PDE5A specifica per il cGMP è stato riportato nella corteccia temporale dei pazienti affetti da AD rispetto ai controlli (Ugarte et al., 2015), mentre senza significativi modifiche è stata rilevata l'espressione della PDE9A specifica per il cGMP o nell'espressione delle PDE2A e PDE10A (Ugarte et al., 2015). Gli inibitori delle PDE5A sono invece in grado di migliorare i deficit dell'LTP nei sinaptosomi dei pazienti con AD (Prieto et al., 2017) e ridurre la citotossicità, il carico di A β , l'iperfosforilazione di tau, la disfunzione sinaptica e il deficit della memoria nei topi AD (Palmeri et al., 2013)(Puzzo et al., 2009) in modo PKG dipendente.

2.2.2 Regolazione dell'attività trascrizionale di CREB nei neuroni e suoi coattivatori

La proteina CREB è ampiamente espressa nel cervello e in particolare nelle regioni essenziali per codificare l'apprendimento e la memoria, tra cui l'ippocampo e la corteccia. CREB è una proteina da 43 kDa che si lega alla sequenza consenso CRE altamente conservata 5'-TGACGTCA-3'. CREB appartiene alla superfamiglia bZIP dei fattori di trascrizione che sono strutturalmente caratterizzati da un dominio a cerniera della leucina che media la dimerizzazione e una regione basale C-terminale che si lega al DNA. Questa famiglia di fattori di trascrizione include CREB, il modulatore di elezione (cAMP) e il

fattore di trascrizione 1 (ATF-1) (Lonze & Ginty, 2002). L'omologia e la struttura della sequenza consentono interazioni omo- ed eterodimeriche tra i membri di questa famiglia di fattori di trascrizione. È stato descritto che isoforme di splicing alternativo di CREM e CREB agiscono come attivatori o repressori della trascrizione (Foulkes, Borrelli, & Sassone-Corsi, 1991)(Walker & Habener, n.d.). Diversi stimoli extracellulari convergono nel nucleo per attivare l'espressione genica attraverso CREB. (Figura 2) Segnali cellulari che aumentano i livelli intracellulari di cAMP e Ca^{2+} innescano la fosforilazione del CREB sulla Ser133, un passaggio obbligato per la trascrizione CREB-dipendente di più geni tra cui somatostatina e c-fos (Gonzalez & Montminy, 1989)(Sheng, Thompson, & Greenberg, 1991). Diverse chinasi attivate dai secondi messaggeri sono in grado di fosforilare CREB su Ser133, rendendola un punto di potenziale convergenza per più vie di segnalazione intracellulare. Tra le chinasi che mediano la fosforilazione di CREB sulla Ser133 ci sono Ca^{2+} /calmodulina (CaM), le proteine chinasi CaMKII e CaMKIV, la proteina chinasi attivata con ras-mitogeno (MAPK/ERK), e le chinasi attivate da MAPK e cAMP-protein chinasi A dipendente (PKA) (Deisseroth, Bito, & Tsien, 1996). L'attivazione di CREB da parte di chinasi distinte dipende da diversi fattori tra cui il tipo di cellula, lo stimolo fisiologico e i secondi messaggeri coinvolti. La fosforilazione della proteina CREB è rapidamente evocata dagli stimoli sinaptici che inducono il potenziamento e la depressione della forza sinaptica, mentre i potenziali d'azione ad alta frequenza da soli non riescono a indurre la fosforilazione della proteina CREB (Deisseroth et al., 1996). La fosforilazione della proteina CREB e la traslocazione nucleare indotte dall'attività sinaptica sono largamente mediate dall'infusione del Ca^{2+} , dalla mobilitazione di CaM al nucleo e dall'attivazione di CaMKIV (Deisseroth et al., 1998). Il meccanismo con il quale il Ca^{2+} locale viene trasportato al nucleo per attivare la trascrizione dei geni coinvolge la traslocazione di CaM mediata dai canali del calcio a voltaggio dipendente di tipo L (VGCC), i recettori NMDA e l'attivazione del pathway MAPK/ERK (Dolmetsch, Pajvani, Fife, Spotts, & Greenberg, 2001). In effetti, il metodo specifico di ingresso del Ca^{2+} in un neurone determina quali percorsi di segnalazione saranno poi attivati e quali saranno le specifiche risposte cellulari al calcio. Per esempio, l'infusione di Ca^{2+} attraverso VGCC di tipo L apporta un contributo minore alla corrente di calcio indotta dalla sinapsi, ma è particolarmente efficace per attivare la trascrizione

dipendente dal CREB (Pardy et al., 1992)(A. E. West et al., 2001). La fosforilazione del CREB è essenziale ma non sufficiente per la trascrizione genica. Pertanto, neurotrasmettitori e fattori di crescita sono in grado di indurre la fosforilazione di CREB sulla Ser133, sebbene non inducano sempre l'espressione genica (Bonni, Ginty, Dudek, & Greenberg, 1995). La tempistica e la durata della fosforilazione di CREB sono cruciali per la trascrizione mediata da CREB. Per esempio, gli stimoli che inducono una fosforilazione a lungo termine di CREB sulla Ser133 si traducono in espressione genica dipendente dalla CRE (Bito, Deisseroth, & Tsien, 1996). CREB è rapidamente fosforilata da una via CaMKIV-dipendente in risposta all'attività neuronale indotta da condizioni depolarizzanti, stimolazione sinaptica o allenamento comportamentale (Bito et al., 1996). Questo è seguito da una fosforilazione decisamente più lenta ma duratura che dipende da CaMKIV e Ras/MAPK che sono importanti per l'attivazione dell'espressione genica (X. Wu & McMurray, 2001). Tuttavia, la trascrizione dipendente dalla proteina CREB dipende da molteplici meccanismi cellulari che agiscono di concerto con la fosforilazione di CREB sulla Ser133, inclusi ulteriori siti di fosforilazione, eventi di defosforilazione e legame con il macchinario trascrizionale attraverso i coattivatori. CREB contiene siti di consenso per diverse chinasi che regolano l'attività trascrizionale di CREB (Gonzalez & Montminy, 1989). La fosforilazione di CREB sulla Ser142 e sulla Ser143 in risposta a Ca^{2+} signaling, che è mediata da CaMKII e/o caseina chinasi II, è richiesta per la trascrizione genica dipendente dal Ca^{2+} indotta (Kornhauser et al., 2002). Le conseguenze funzionali di questi ulteriori siti di fosforilazione multipli sulla trascrizione dipendente dal CREB sono in gran parte poco chiare, sebbene sia possibile che esse partecipino alla regolazione di specifici programmi di espressione genica. La fosforilazione di CREB sulla Ser142 aumenta con la stimolazione della luce, mentre la mutazione della Ser142 nell'alanina nei topi knock-in riduce l'espressione di c-fos e mPer1 e sposta il ritmo circadiano (Mantamadiotis et al., 2002). Nelle demenze il ruolo stimolante della fosforilazione dei siti Ser142/Ser143 sulla trascrizione mediata da CREB abolisce l'interazione di CREB e CBP, suggerendo come CREB possa mediare programmi di espressione genica indipendentemente dal CBP (Kornhauser et al., 2002). L'inattivazione della calcineurina indotta dall'attività sinaptica estende i tempi e i livelli del CREB fosforilato e della trascrizione genica attraverso l'inattivazione della fosfatasi proteica

nucleare 1 (PP1) (Bito et al., 1996). Infine, il legame di CREB con i promotori contenenti CRE è strettamente regolato dal segnale dell'ossido nitrico e dai coattivatori di CREB (Riccio et al., 2006).

In che modo CREB facilita le risposte specifiche a particolari stimoli fisiologici? Diversi stimoli cellulari convergono sulla fosforilazione del CREB, un evento che media diverse risposte cellulari specifiche che attivano l'espressione di particolari insiemi di geni o programmi genici. Sebbene l'esatto meccanismo/i con cui CREB attiva l'espressione dei set di geni siano ancora in gran parte sconosciuti, le nuove conoscenze derivano dagli studi condotti sui suoi coattivatori. Quindi, mentre i segnali di cAMP e MAPK/stress inducono livelli simili di CREB fosforilato, il cAMP è il più efficace dei segnali di stress nella stimolazione della formazione di complessi CREB/CBP (Mayr, Canettieri, & Montminy, 2001). Questi risultati suggeriscono che gli effetti dei segnali cAMP e il mitogeno/segnale di stress sulla formazione del complesso CREB/CBP possono conferire selettività alla trascrizione genica.

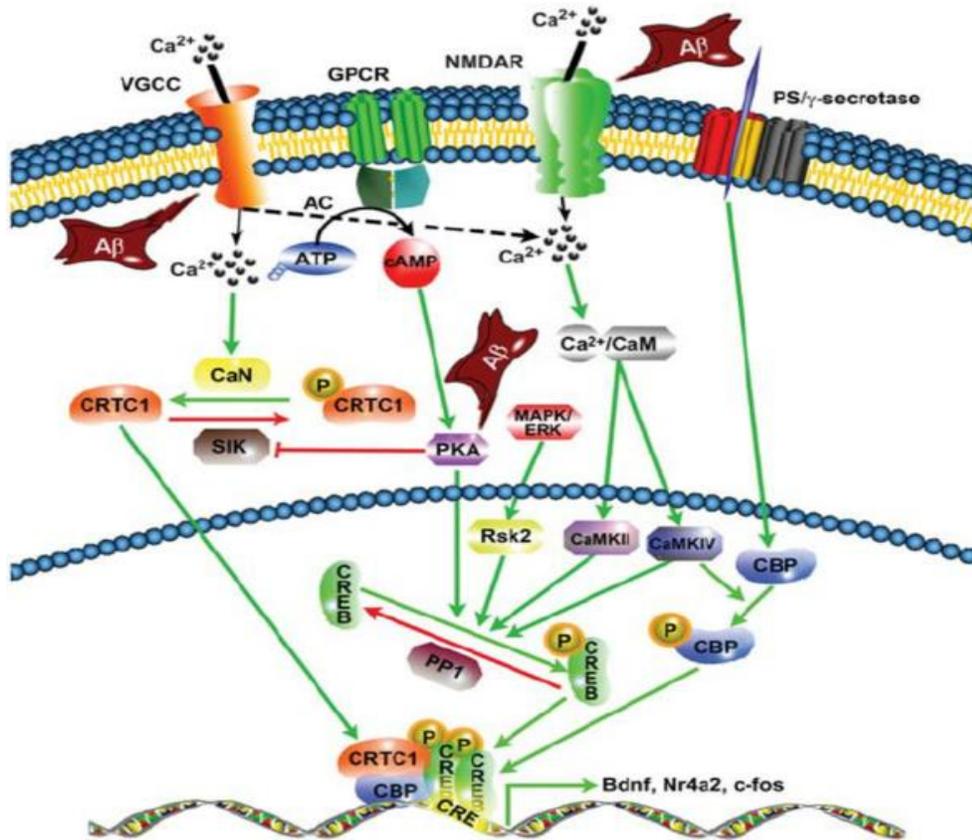


Figura 2. Vie di segnalazione che regolano la trascrizione dipendente dal CREB nei neuroni. La comunicazione tra sinapsi, citoplasma e nucleo in risposta a molteplici stimoli extracellulari richiede la funzione e la coordinazione di più proteine citoplasmatiche e nucleari. Le variazioni dei livelli intracellulari di secondi messaggeri come Ca^{2+} e cAMP convergono nel citoplasma fosforilati (Ser133), attivano e traslocano CREB nel nucleo (frecche verdi). Molteplici vie di segnalazione si incrociano nei neuroni per regolare l'attività della proteina CREB (frecche rosse). L'attivazione simultanea di questi percorsi potrebbero contribuire alla trascrizione dipendente dal CREB richiesta per la memoria a lungo termine. Nella malattia di Alzheimer, $A\beta$ generata dall'elaborazione dipendente da PS1/ γ -secretasi di APP interferisce con le vie regolate dal CREB, compresi i recettori NMDA, i VGCC di tipo L, la PKA e la calcineurina. Abbreviazioni: peptide β , β -amiloide; AC, adenilato ciclasi; ATP, adenosina 5'-trifosfato; Ca^{2+}/CaM , calcio/calmodulina; CaMKII, chinasi II calcio/calmodulina-dipendente; CaMKIV, chinasi di calcio/calmodulina-dipendente IV; cAMP, adenosina ciclica 3',5'-monofosfato; CaN, calcineurina; CBP, proteina legante CREB; CRE, elemento di risposta cAMP; CREB, proteina di legame dell'elemento di risposta del cAMP; CRT1, Coattivator-1 di trascrizione regolato da CREB; GPCR, recettore accoppiato a proteine G; MAPK/ERK, protein chinasi attivata da ras-mitogen; NMDAR, recettore di N-metil-D-acido parpartico; PKA, protein chinasi A; PS, presenilins; Rsk2, proteina ribosomale S6 chinasi-2; SIK, chinasi inducibile al sale; VGCC, canali di calcio voltaggio-dipendenti.

2.2.3 Funzione di CREB nell'apprendimento e nella memoria

Il potenziamento a lungo termine dell'effetto sinaptico è postulato per la memoria dall'ippocampo. Studi pionieristici hanno mostrato che la composizione e i cambiamenti strutturali delle sinapsi sono modulate dall'apprendimento e dalla memoria (Bailey & Chen, 1983). Allo stesso modo, l'induzione di forme durature della plasticità sinaptica nell'ippocampo CA1 provoca la comparsa di nuove spine sui dendriti postsinaptici (Engert & Bonhoeffer, 1999). Questi cambiamenti nella struttura delle sinapsi richiedono l'espressione di nuovi geni (Kandel, 2001). Il ruolo importante che l'espressione genica ha nella memoria è stato descritto più di 20 anni fa in studi che dimostrano che la memoria a lungo termine richiede una "nuova" espressione genica mediata dai geni della famiglia CREB. Il DNA esogeno iniettato contenente sequenze CRE nel mollusco *Aplysia* ha compromesso una forma di facilitazione sinaptica a lungo termine denominata potenziamento a lungo termine (LTP), senza influire sulla memoria a breve termine (Dash et al., 1990). È interessante notare che gli stimoli che inducono la plasticità sinaptica attivano la trascrizione dei geni mediati dalla proteina CREB (Kaang, Kandel, & Grant, 1993). Questi risultati hanno suggerito per la prima volta che la trascrizione mediata da CRE è stata coinvolta in cambiamenti plastici che mediano l'archiviazione della memoria (Kandel, 2001). Ulteriori studi su *Aplysia* hanno rivelato che CREB facilita la conversione della plasticità sinaptica a breve e lungo termine (Bartsch, Casadio,

Karl, Serodio, & Kandel, 1998). La facilitazione sinaptica e la crescita di nuove connessioni sinaptiche in *Aplysia* dipendono dalla trascrizione mediata da CREB (Martin, Casadio, et al., 1997). Nella *Drosophila*, l'espressione di un transgene dominante del CREB negativo inibisce l'acquisizione della memoria a lungo termine, mentre l'induzione dell'espressione della proteina CREB migliora la formazione della memoria (Yin et al., 1994). Questi studi hanno stabilito le basi per un coinvolgimento di CREB nell'apprendimento e nella memoria negli invertebrati. Un ruolo essenziale della via di segnalazione cAMP/PKA sulla memoria è stato stabilito nei vertebrati. La disregolazione genetica dell'adenilato ciclasi (AC) o l'inibizione farmacologica della segnalazione di cAMP porta a deficienze nell'LTP a lungo termine e nella memoria spaziale dipendenti dall'ippocampo (Huang, Li, & Kandel, 1994). Allo stesso modo, la distruzione della PKA nell'ippocampo dei topi comporta una significativa diminuzione della LTP tardiva, mentre la trasmissione sinaptica basale e la LTP precoce rimangono invariate (Abel et al., 1997). I deficit nella plasticità sinaptica negli animali la cui proteina PKA è mutata sono associati a deficit nella memoria spaziale a lungo termine e nella memoria associativa, mentre l'apprendimento e la memoria a breve termine rimangono invariate (Abel et al., 1997). È ben noto che la via di segnalazione di CREB partecipa alla formazione della memoria spaziale, associativa, emotiva e sociale. L'acquisizione della paura emotiva contestuale è associata ad una maggiore trascrizione del gene CREB mediata nell'ippocampo e l'addestramento nei compiti di memoria spaziale induce l'espressione di specifici geni bersaglio di CREB (J F Guzowski, Setlow, Wagner, & McGaugh, 2001). Questi studi indicano che l'apprendimento e la memoria a lungo termine richiedono l'espressione di geni bersaglio come CREB immediatamente precoci in specifiche regioni del cervello (John F Guzowski et al., 2005). Il ruolo di CREB nella memoria sembra dipendere dal dosaggio genico e dal circuito della memoria. L'inibizione della proteina CREB nella regione CA1 dell'ippocampo dorsale in topi geneticamente modificati interrompe alcune forme di plasticità sinaptica e di apprendimento spaziale ma non il condizionamento del contesto (Pittenger et al., 2002). Al contrario, l'aumento cronico dell'attività CREB ritarda l'acquisizione e interferisce con il recupero della memoria spaziale dipendente dall'ippocampo (Viosca, Lopez de Armentia, Jancic, & Barco, 2009)(Viosca, Malleret, et al., 2009).

2.2.4 Creb e Alzheimer's disease

Come ampiamente riportato nei paragrafi precedenti l'accumulo di mutazioni di A β e APP giocano un ruolo centrale nella patogenesi dell'AD, sebbene i meccanismi molecolari specifici con cui essi causano la disfunzione sinaptica e la perdita della memoria siano ancora in gran parte sconosciuti. Prove recenti indicano che l'effetto di A β sulla plasticità sinaptica della formazione ippocampale, sulla memoria e sulla perdita della sinapsi è mediato dalla via di segnalazione CREB. La prima evidenza di questo collegamento proviene da studi di Vitolo e colleghi che dimostrano che A β 1-42 ha ridotto l'attività della PKA e ha interrotto la LTP nelle sezioni ippocampali (Vitolo et al., 2002). I deficit di plasticità neuronale indotti da A β 1-42 erano associati a livelli ridotti di CREB fosforilato (Vitolo et al., 2002), da un meccanismo che poteva coinvolgere l'endocitosi dei recettori NMDA attraverso la calcineurina/STEP (Snyder et al., 2005). L'oligomero di A β , la specie A β più tossica, inibisce anche la fosforilazione del CREB nei neuroni primari mediante un meccanismo che comporta la riduzione dei recettori NMDA (Q.-L. Ma et al., 2007). Livelli ridotti di cAMP e cambiamenti nella composizione delle subunità regolatorie e/o catalitiche di PKA causate da accumuli di A β sono associati ad una diminuzione della fosforilazione della proteina CREB nei neuroni dei cervelli AD (Vitolo et al., 2002)(Yamamoto-Sasaki et al., 1999). Sebbene l'A β 1-42 sintetico riduca la fosforilazione del CREB indotta dalla depolarizzazione e dal glutammato nei neuroni primari, A β 1-42 non influenza la fosforilazione del CREB nei neuroni maturi in condizioni basali o stimolati dalla forskolina (Vitolo et al., 2002)(Snyder et al., 2005). Recentemente un gruppo di ricerca ha studiato l'effetto delle specie A β secrete naturalmente sulla segnalazione CREB nei neuroni primari da topi transgenici APP Swe, Ind che esprimono APP umana e secernono peptidi A β 1-40 e A β 1-42 a livelli che non influenzano la sopravvivenza neuronale e il numero delle sinapsi. In accordo con i precedenti risultati, la fosforilazione del CREB è indotta in modo simile dai segnali di Ca²⁺/cAMP nei neuroni APP Sw, Ind (España et al., 2010). Sorprendentemente, l'attivazione della trascrizione dipendente dalla proteina CRE è rimasta invariata dalla forskolina, ma è stata significativamente ridotta da un agente depolarizzante KCl (~25%) o KCl più forskolina (~50%) a livello dei neuroni corticali e ippocampali APP Swe, Ind. (España et al., 2010). I deficit trascrizionali CRE nei neuroni

APP Swe, Ind sono probabilmente attribuibili all'effetto diretto di A β perché sono prevenuti inibendo la produzione di A β . Inoltre, CRTC1, CRTC2 o un CRTC1 attivo costitutivo, ma non un mutante CREB privo del dominio di legame CRTC, risolvono efficientemente i deficit di trascrizione CRE nei neuroni primari APP Swe, Ind che indicano che CRTC media l'effetto negativo di A β su CREB indotti dai segnali cAMP e Ca²⁺ (España et al., 2010). Il meccanismo con cui A β distrugge la trascrizione di CREB mediata da CRTC1 in risposta a segnali di depolarizzazione e cAMP comporta una diminuzione della mobilizzazione intracellulare del Ca²⁺ attraverso VGCC di tipo L e ridotta defosforilazione di CRTC1 a Ser151 mediata da Ca²⁺/calcineurina (España et al., 2010). Un ruolo della calcineurina sulla patologia dell'AD è coerente con i precedenti risultati che dimostrano una ridotta attività della calcineurina e l'espressione nel cervello di pazienti con AD e topi transgenici (Lian, Ladner, Magnuson, & Lee, 2001)(Celsi et al., 2007). I risultati sopra riportati forniscono importanti informazioni sui meccanismi molecolari alla base delle variazioni dell'espressione genica nell'AD. In particolare, A β altera l'espressione neuronale dei geni dipendenti da CRTC1 correlati alla plasticità sinaptica come *c-fos*, *Bdnf IV* (esone IV) e *Nr4a2*, ma non *Cyr61*, un gene target CREB attivato indipendentemente da CRTC1 (España et al., 2010). È significativo che il trascritto *Bdnf* più altamente espresso nella corteccia umana *Bdnf IV*, che è attivato dall'influenza del calcio in risposta all'attività neuronale, sia stato precedentemente dimostrato essere regolato negativamente per via oligomerica ma non fibrillare dell'A β 1-42 (Garzon & Fahnestock, 2007). La diminuzione dell'espressione di *Bdnf IV* da parte dell'oligomero A β 1-42 era associata a diminuzione della fosforilazione di CREB in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate (Garzon & Fahnestock, 2007). In particolare, i livelli di BDNF sono diminuiti nel cervello dei pazienti con AD e dei topi transgenici (H. S. Phillips et al., 1991)(Ferrer et al., 1999), mentre il ridotto *c-fos* è associato all'apprendimento e alla memoria in topi transgenici APP (Palop et al., 2003)(Dewachter et al., 2009). È importante sottolineare che l'espressione interrotta di geni dipendenti da CRTC1 come *c-fos*, *Bdnf IV*, *Nr4a2* e *Arc* coincide con deficit precoci di memoria spaziale a lungo termine in topi transgenici APP Swe, Ind (España et al., 2010).

2.3 Metodi

2.3.1 Animali

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando topi C57BL/6 di 3-4 mesi maschi e femmine ospitati presso la struttura zootecnica della Columbia University. I topi sono stati mantenuti su un ciclo 12 ore luce/buio in condizioni stabili in termini di temperatura, umidità e ventilazione. L'acqua e il cibo venivano offerti *ad libitum*.

2.3.2 Preparazione di tau ricombinante

Il costrutto tau 4R/2N è stato preparato in un vettore di espressione pET29a (Bioclone) nel ceppo batterico BL21 (DE3) per l'espressione proteica, come descritto in precedenza (Fá et al., 2016). Le cellule sono state striate su LB piastre di ampicillina agar e una singola colonia è stata raccolta e cresciuta durante la notte con una miscela di sovraespressione e brodo di espansione (Zymo Research). Le cellule sono state pellettate e poi centrifugate a 6000 g per 30 minuti in un centrifuga GS3 a 4°C. I lisati cellulari sono stati lisati in una soluzione salina tamponata con fosfato Triton-X-100 al 2% con miscela di inibitori proteici. La streptomicina solfato è stata aggiunta per precipitare il DNA. Dopo la centrifugazione il surnatante è stato riscaldato a 100°C per 15 minuti e il precipitato è stato rimosso mediante centrifugazione. Dopo aver aggiunto TCEP e 1% PCA, il pH del supernatante è stato neutralizzato usando NaOH 1N. Per la prima fase di purificazione, il surnatante è stato trasferito in una cassetta slide-A-lyser (20 MWCO) e tamponato per rimuovere i prodotti chimici in eccesso. In seguito il surnatante è stato caricato sulle colonne His-Spin Protein Miniprep (Zymo Ricerca) ed eluito con tampone fosfato contenente 250 mM di imidazolo. Per l'oligomerizzazione, tau è stato trasferito in una cassetta e un tampone a diaframma di scambio e tampone per l'oligomerizzazione dopo incubazione con 1 mM di H₂O₂ a temperatura ambiente per 20 ore per l'introduzione di legami disolfuro. La concentrazione della proteina tau è stata determinata dall'assorbimento a 280 nm con un coefficiente di estinzione di 7450 cm⁻¹M⁻¹ e gli oligomeri sono stati visualizzati attraverso western blotting. Gli oligomeri sono trasferiti in gel di Tris-Acetate e poi immunoblotting su membrana di nitrocellulosa. L'anticorpo primario è stato diluito a una concentrazione finale di 1:1000 per

l'immunoblotting (anticorpo anti-tau; EP2456Y; RabMad). L'anticorpo secondario goat anti-rabbit (1:10000) fu acquistato dalla ThermoScientific.

2.3.3 Western Blotting della proteina CREB su cervello di topo

I lisati ippocampali sono preparati come descritto in precedenza (Y. I. Francis et al., 2009). Il tessuto ippocampale è omogeneizzato in tampone di lisi (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 3% SDS) e incubato a 4 °C per 60 minuti, quindi sonicato prima della centrifugazione a 13.000 rpm per 15 minuti. L'anticorpo primario p-CREB è stato comprato dalla Millipore (diluizione 1:1000, 5% BSA in TRIS-buffered saline (TBS) 1X e Tween80), l'anticorpo per t-CREB proviene dalla Millipore (diluizione 1:1000 5% latte in TBS), l'anticorpo GAPDH (1:5000, 5% latte in TBS) comprato dalla MilliporeSigma (St. Louis, MO, USA), l'anticorpo istone 3 acetilato sulla lisina 27 (acH3K27) (1:2,000, 5% latte in TBS) and l'anticorpo istone H3 totale (1:5,000, 5% latte in TBS) sono stati comprati dalla New England BioLabs (Ipswich, MA, USA), l'anticorpo β -III-Tubulin è stato ottenuto da Promega (diluizione 1:1000). L'anticorpo Arc (1:1000, 5% BSA in TBS 1x e Tween80) and l'anticorpo cFos (1:200, 5% BSA in TBS 1x e Tween80) sono stati comprati dalla Abcam (Cambridge, United Kingdom). Per confermare il caricamento uguale e quindi determinare continuare l'analisi, sono stati analizzati i segnali ottenuti per ogni singolo campione caricato con il corrispondente anticorpo e l'anticorpo per tubulina o GAPDH come controllo. I dati ottenuti tramite sono stati quantificati misurando la banda d'intensità utilizzando un software di imaging (NIH ImageJ).

2.3.4 Misurazione del cGMP nell'ippocampo del topo.

I livelli di cGMP sono stati quantificati in doppio con il metodo Enzyme Immunoassay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) seguendo le linee guida del produttore. I lisati ippocampali sono stati raccolti, immediatamente congelati in ghiaccio secco e pesati. I campioni sono stati omogeneizzati in una soluzione di acido tricloroacetico al 5% contenente 3-isobutil-1-metilxantina (100 μ M) usando un omogeneizzatore con motore a pestello e centrifugato a 6000 rcf per 20 minuti. Il surnatante è stato raccolto, trattato con una soluzione di etere satura e riscaldato per 20

minuti per rimuovere il residuo di etere. Il cGMP è stato misurato utilizzando un lettore di micropiastre (Tecan 200) utilizzando una lunghezza d'onda di 410 nm.

2.3.5 Preparazione dei farmaci utilizzati

Per l'esperimento LTP, tutti i composti sono disciolti nel liquido cerebro spinale artificiale (ACSF) per raggiungere la concentrazione finale richiesta. Questi sono: DEA/NO, ODQ, BAY41-2272 e 8-Br-cGMP diluito in 0,1% DMSO; mentre il sildenafil e il composto 7a in DMSO allo 0,05%. DEA/NO è stato conservato per 24 ore in soluzione alcalina (0,01 m NaOH) e diluito in ACSF immediatamente prima dell'uso. Per gli esperimenti comportamentali, il composto 8-pCPT-cGMP e' stato sciolto in DMSO al 2% e Tween al 2%, mentre il 7° è stato sciolto in DMSO al 4% e Tween al 2%. Il composto 7a è stato sintetizzato in sei fasi (Fiorito et al., 2013), mentre DEA/NO e BAY41-2272 sono stati acquistati da Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA), 8-Br-cGMP da Biolog Life Science Institute (Brema, Germania), ODQ da prodotti chimici Cayman (Ann Arbor, MI, USA), il sildenafil e 8-pCPT-cGMP dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3.6 Registrazione tramite elettrofisiologia

I topi sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale e gli ippocampi sono stati rimossi immediatamente dopo la decapitazione e tagliati in fette trasversali di 400 μm tramite un chopper. In seguito le fette sono state trasferite nella camera di registrazione in cui le condizioni fisiologiche del cervello sono state mantenute grazie alla continua perfusione di ACSF ininterrottamente gorgogliate con il 95% O₂ e 5% di CO₂. L'ACSF consisteva in (in mM): NaCl (124,0), KCl (4,4), Na₂HPO₄ (1,0), NaHCO₃ (25,0), CaCl₂ (2,0), MgCl₂ (2,0) e glucosio (10,0). Le fette devono essere tagliate almeno 90 minuti prima di iniziare le registrazioni in camera di Faraday. Un elettrodo di tungsteno bipolare e un elettrodo di vetro sono riempiti con ACSF e sono collocati rispettivamente nelle fibre collaterali di Schaeffer e nello strato CA1 *radiatum*. È stata utilizzata un'analisi input-output al fine di determinare la pendenza massima della risposta e la linea di base è stata registrata ogni minuto con circa il 35% della pendenza massima evocata (Vitolo et al., 2002). Dopo che si è registrata una baseline stabile per 30 minuti, una LTP è stata

indotta usando una stimolazione theta-burst ed è stata registrata per 2 ore dopo la tetanizzazione. L'LTP misurata come pendenza field-EPSP (fEPSP) è espressa come percentuale della linea di base ed i risultati sono stati rappresentati come media \pm SEM.

2.3.7 Chirurgia stereotassica e metodo di infusione

Prima di fissare i topi al dispositivo stereotassico, abbiamo anestetizzato l'animale grazie a un' iniezione intraperitoneale di Avertina (500 mg/Kg). Agli animali è stato successivamente iniettato un analgesico (Carprofen per via sottocutanea sulla schiena, 5 mg/Kg) e un anestetico locale (Marcaina sottocutanea sotto il cuoio capelluto 3 mg/Kg). Al topo è stato rimosso il pelo sul cranio. Una volta posizionato è stata sterilizzata la parte della futura incisione con betadina e alcool al 70%. L'incisione è stata fatta a livello della linea mediana del cranio e l'area sottostante è stata ripulita dai tessuti usando un cotone sterile imbevuto di H₂O₂. Le coordinate dell'ippocampo dorsale sono 2,46 mm posteriormente e 1,5 mm lateralmente dalla Bregma (destra e sinistra) ad una profondità di 1,30 mm. La cannula guida di calibro 26 (PlasticOnes) è fissata al cranio utilizzando cemento dentale acrilico (Paladur). Lasciato asciugare il topo è stato richiuso con punti di sutura tramite punti di sutura. Per i due giorni seguenti i topi sono stati trattati con antibiotico onde evitare infezioni. Dopo 6-9 giorni di recupero, i topi sono stati iniettati bilateralmente con oligomeri di tau (α Tau) (500 nM) o veicolo fino a un volume finale di 1 μ l. Per le iniezioni, sono state usate siringhe di precisione Hamilton collegate a un tubo di polietilene alla fine del quale è stata fissata una microsiringa interno (cannula interna). Per tutti i test comportamentali, i topi sono stati iniettati intraventricolarmente nell'ippocampo, due volte a 3 ore e 20 minuti prima dell'esercizio. Dopo l'infusione, l'ago è stato tenuto in posizione per garantire diffusione completa.

2.3.8 Studi comportamentali

Memoria spaziale a breve termine.

Il RAWM è costituito da una piscina circolare bianca di 120 cm di diametro, riempita con vernice bianca atossica per rendere l'acqua opaca. All'interno della vasca c'è un apparato costituito da sei braccia che si irradiano dall'area centrale, formando sei braccia. Spunti spaziali erano presenti sulle pareti della camera. Durante tutto il test, la temperatura

dell'acqua è stata mantenuta stabile a 24 ± 2 °C. La piattaforma è posizionata all'estremità di una delle braccia, immersa nell'acqua. La posizione della piattaforma (diametro di 10 cm) è mantenuta costante per ogni animale, mentre la posizione di partenza differiva tra le prove. Il test dura per due giorni consecutivi e ogni topo è sottoposto a 15 prove al giorno. Il primo giorno, i topi sono addestrati per 15 prove, le prime 12 prove sono alternate tra prove 'visible' (in cui la piattaforma contrassegnata e visibile) e 'non visible' (in cui la piattaforma è 1 cm sotto la superficie dell'acqua). Le ultime 3 prove del primo giorno e tutte le 15 prove del secondo giorno sono fatte con la piattaforma nascosta. In ciascuno dei tentativi, all'animale è permesso di nuotare liberamente entro 60 secondi nel labirinto per trovare la piattaforma. Una volta sulla piattaforma, il topo è posizionato per 20 secondi sulla piattaforma e libero di osservare i segnali visivi circostanti. Se un topo non è stato in grado di trovare la piattaforma all'interno 60 secondi, lo sperimentatore lo guida verso la piattaforma per i 20 secondi di permanenza. Durante la prova di 1 minuto, ogni volta che il topo ha nuotato in un braccio diverso dal braccio obiettivo (in cui si trovava la piattaforma) o se il topo non prendeva alcuna decisione in quale braccio andare entro 10 secondi, viene registrato come errore. L'entrata in un braccio è definita come l'entrata di tutte e quattro le zampe del topo nel braccio. Dopo aver completato ogni prova, il topo è rimosso dalla piscina, delicatamente asciugato e riposto nella sua gabbia sotto una lampada termica. Evitare i limiti di apprendimento imposti dalla pratica eccessiva e evitare l'affaticamento che può derivare da allenamenti di pratica distanziati consecutivi è stato stabilito eseguendo i topi in coorti di 4 o 5 e alternando diverse coorti attraverso le 15 prove durante il periodo dei test che si svolgono ogni giorno. Il risultato viene calcolato dividendo le 30 prove in 10 blocchi. Ogni blocco rappresenta la media dell'errore di 3 prove consecutive. Entrambe i giorni i topi sono iniettati con oTau nell'ippocampo. Il trattamento è dato dopo il secondo e il quarto blocco di prove ogni giorno.

Condizionamento alla paura

Il test di condizionamento alla paura è stato utilizzato per la valutazione della memoria associata alla paura nei roditori. Il test consiste di un totale di 3 giorni, nel quale il primo giorno gli animali sono collocati nella camera (Noldus) per 2 minuti prima della

presentazione dello stimolo condizionale (tono; 880 Hz a 85 Db) e durante il quale sono liberi di muoversi e curiosare in giro. Negli ultimi 2 secondi i topi ricevono uno stimolo incondizionato (shock nel piede 0,8 mA). Dopo i 2 stimoli, i topi sono lasciati nella camera per altri 30 minuti in assenza di stimoli. Il secondo giorno i topi sono posti nella stessa camera di condizionamento per altri 5 minuti senza la presenza di tono di shock per valutare la “memoria contestuale (contextual fear conditioning)”. Vengono monitorati alcuni parametri di riferimento tra cui il “blocco” (freezing) la cui caratteristica distintiva è l'assenza totale di movimento. Questa mancanza di movimento (tranne la respirazione), è monitorata durante il test utilizzando un sistema di tracciamento e analisi della visione (Ethovision XT, Noldus). Il terzo giorno è stata valutata la memoria “cued” (cued fear conditioning) alla paura. Per questo, i topi sono stati collocati nella stessa camera con pareti modificate, l'odore proveniente dal pavimento è vaniglia, che rappresenta una variabile totalmente nuova. Nel corso dei 5 minuti, 2 minuti sono dedicati alla libertà di esplorazione che è poi seguita da esposizione per 3 minuti dello stimolo condizionale. Per il condizionamento della paura, i topi sono stati iniettati con il farmaco seguendo quanto sopra descritto solo il primo giorno dell'esperimento comportamentale. Il trattamento è stato dato immediatamente dopo lo shock del piede per esaminare l'effetto del trattamento nel consolidamento della memoria alla paura contestuale. Inoltre, la somministrazione del trattamento dopo lo shock del piede esclude la possibilità di interferenza con la percezione del dolore.

Campo aperto (“open field”)

Il test è stato utilizzato per valutare il comportamento esplorativo e i livelli di ansia (Prut & Belzung, 2003). I topi sono stati collocati in un nuovo ambiente aperto composto da pareti trasparenti in plexiglass (modello ENV-520; Med Associates, St. Albans, Vermont) (43,2 cm di lunghezza x 43,2 cm di larghezza x 30,5 cm di altezza). I topi sono collocati nel campo aperto. La loro attività è stata registrata automaticamente per 10 minuti, in due giorni consecutivi. oTau è infuso entrambe i giorni. I topi sono stati trattati con il composto ogni giorno dopo la fine del test.

Valutazione della soglia sensoriale

Il test è stato utilizzato per valutare la percezione dell'animale allo shock. Il test è stato eseguito l'ultimo giorno di esperimenti, e gli animali sono posti nella stessa camera dove ha avuto luogo il test del condizionamento alla paura. Gli animali sono sottoposti a shock del piede per 1 secondo di intensità crescente da 0,1 a 0,7 mA a incrementi di 0,1 mA ogni 30 secondi. Il comportamento è stato registrato dal software di acquisizione video (Ethovision XT) ed è stato valutato manualmente. I grafici rappresentano la media dell'intensità del foot shock che ha suscitato la prima risposta visibile (flinching), la seconda risposta motoria (salto) e la prima risposta udibile (vocalizzazione). I topi sono stati iniettati con oTau prima dell'esperimento come descritto in precedenza.

2.3.10 Analisi statistica

Per le registrazioni elettrofisiologiche i risultati sono stati analizzati tramite ANOVA per misure ripetute che confrontano le tracce dopo la stimolazione tetanica con il trattamento in diverse condizioni come effetto principale. La media degli ultimi 5 punti della curva sono confrontati usando l'ANOVA unidirezionale con le correzioni post-hoc di Bonferroni. Per i test comportamentali, gli animali sono trattati in gruppi in cui si trova il sesso dei topi mantenuto equilibrato tra i gruppi. I risultati sono analizzati con ANOVA per misure ripetute (errori e latenza RAWM) o ANOVA unidirezionale con Bonferroni correzione post-hoc. Per il western blotting, la differenza tra le condizioni sono analizzate usando il t-test o ANOVA unidirezionale. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software Systat 9 (Chicago, IL, USA). Le differenze sono state considerate significative con un valore di p inferiore a 0,05. I risultati sono stati espressi come errore standard della media (SEM).

2.4 Risultati e figure

2.4.1 oTau ha effetto sul meccanismo molecolare che sta alla base della formazione della memoria

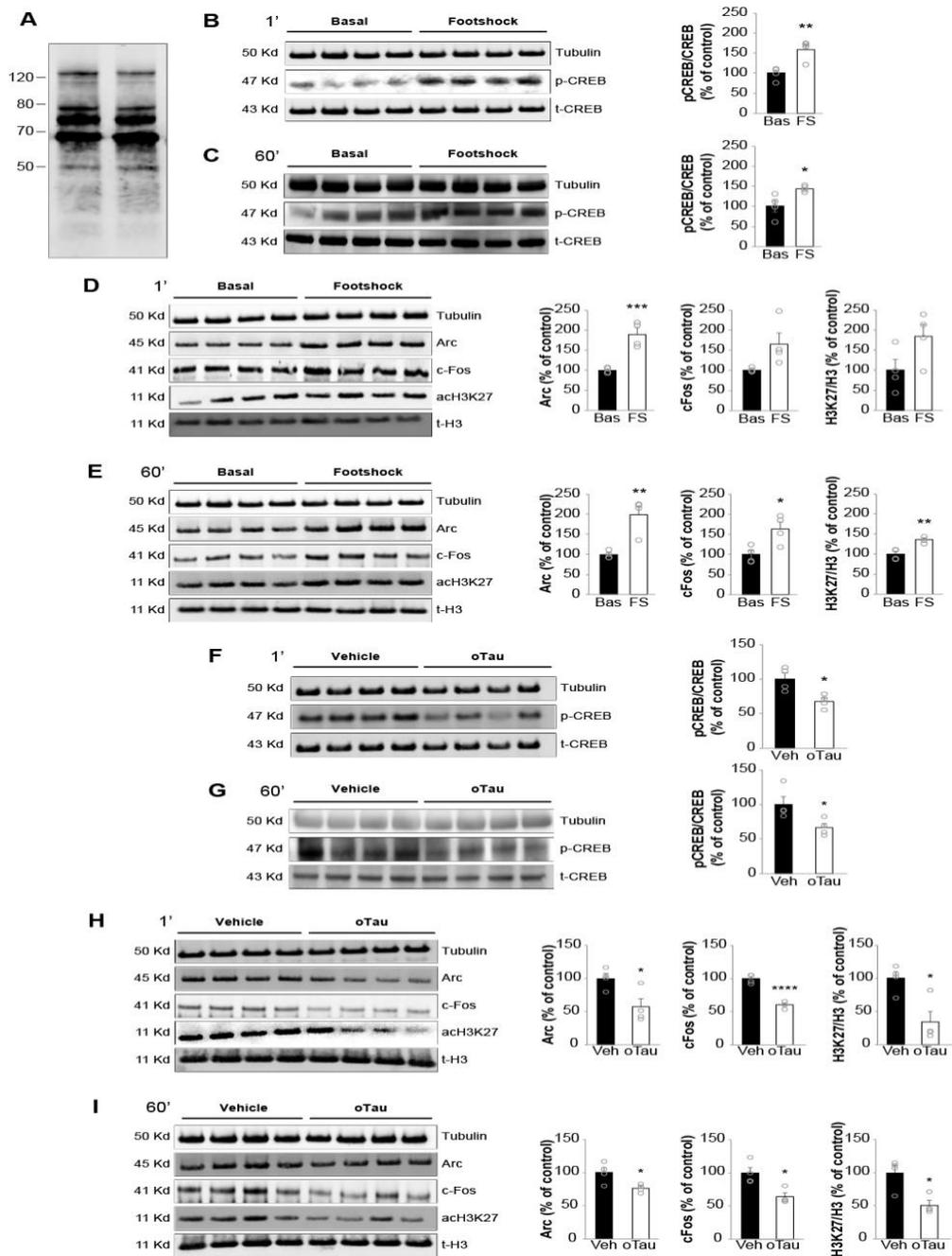


FIGURA 1. oTau altera la fosforilazione di CREB durante la formazione della memoria.

A) Gel SDS-PAGE della preparazione di oTau 4R/2N ricombinante che mostra la presenza di monomeri e oligomeri di dimensioni diverse.

B-C) Fosfo-CREB immunoblots degli omogenati ippocampali di topo precedentemente trattati con/senza footshock per stimolare la memoria indotta dalla paura. Gli ippocampi sono stati raccolti 1 min (B) e 60 min (C) dopo lo footshock. I grafici mostrano il rapporto medio di phospho-CREB (p-CREB)/totale-CREB (t-CREB) (t-test a 1 min: $p = 0,008$; a 60 min: $p = 0,03$; $n = 4$ animali per ciascun gruppo, 2 maschi e femmine per ogni condizione sperimentale; Bas = Baseline; FS = Footshock).

D-E) Immunoblots di acH3K27, c-Fos e Arc su omogenati ippocampali di topo nelle stesse condizioni di B-C. Grafici che mostrano il rapporto medio di acH3K27/totale-H3 (t-H3) (a 1 min: $p = 0,08$; a 60 min: $p = 0,002$), c-Fos (a 1 min: $p = 0,05$; a 60 min: $p = 0,02$), e Arc (a 1 min: $p = 0,001$; a 60 min: $p = 0,004$); $n = 4$ animali, 2 maschi e femmine per ogni condizione sperimentale).

F-G) Immunoblots di Phospho-CREB di omogenati di ippocampo da topi trattati con veicolo (Veh) o oTau (22,95 $\mu\text{g/ml}$). Gli ippocampi sono stati raccolti a 1 minuto (F) e 60 minuti (G) dopo footshock. I grafici mostrano il rapporto medio di p-CREB/t-CREB (t-test non appaiato a 1 min: $p = 0,016$; a 60 min: $p = 0,044$; $n = 4$ per ciascun gruppo, 2 maschi e femmine per ogni condizione sperimentale).

H-I) Immunoblots di acH3K27, c-Fos e Arc di omogenati di ippocampo da topi trattati con veicolo (Veh) o oTau (22,95 $\mu\text{g/ml}$) nelle stesse condizioni di F-G. Grafici che mostrano il rapporto medio di acH3K27/t-H3 (a 1 min: $p = 0,014$, a 60 min: $p = 0,012$), c-Fos (a 1 min: $p < 0,0001$; a 60 min: $p = 0,013$), e Arc (a 1 min: $p = 0,025$; a 60 min: $p = 0,026$). $n = 4$ animali, 2 maschi e femmine per ogni condizione sperimentale. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

Considerando l'effetto importante che l'esposizione di oTau ha sulla plasticità sinaptica e sulla memoria (Fá et al., 2016)(Lasagna-Reeves et al., 2012), abbiamo deciso di determinare se i meccanismi molecolari alla base della formazione della memoria, inclusa la fosforilazione del CREB, sono influenzati da oTau. Per prima cosa abbiamo eseguito un Western Blot per analizzare la presenza di diverse forme di aggregazione di Tau nella nostra preparazione (Figura 1A). Il foot-shock, uno stimolo che viene normalmente utilizzato per l'allenamento nel test di condizionamento della paura, aumenta la fosforilazione della molecola CREB correlata alla memoria dopo 1 minuto e 60 minuti dopo l'induzione della memoria senza influenzare i livelli di tubulina (Figura 1B e 1C).

Questo è stato associato a dei cambiamenti nel meccanismo di trascrizione genica evidenziato da un lieve aumento dell'acetilazione dell'istone 3 (H3) della proteina della cromatina associata al residuo della lisina 27 (acH3K27), 1 min dopo lo shock, che è diventato significativo a 60 minuti, così come nell'espressione di un gene denominato *immediately early gene* che è implicato nella formazione della memoria chiamato *Arc*, sia a 1 che a 60 minuti dopo lo shock (Figura 1D-E). Inoltre, l'espressione di un altro gene ad attivazione precoce, implicato nella formazione della memoria, c-Fos, è leggermente aumentata a 1 min dopo lo shock elettrico e in modo più marcato a 60 minuti (Figura 1D-E). Due iniezioni intra-ippocampali di oTau (a 180 e 20 minuti prima dell'applicazione della scarica elettrica) ad una concentrazione di 22,95 $\mu\text{g/ml}$, precedentemente riscontrate per alterare la formazione della memoria (Puzzo et al., 2011), hanno ridotto i livelli di CREB fosforilato (pCREB), acH3K27, c-Fos e Arc rispetto ai topi di controllo trattati con veicolo dopo 1 min e 60 min senza influenzare i livelli di tubulina (Figura 1F-I). oTau non ha prodotto una modifica di pCREB, acH3K27,

c-Fos e Arc senza stimolazione del foot-shock (dati non mostrati). Presi insieme, questi dati hanno dimostrato che, analogamente agli oligomeri di A β extracellulari (Fá et al., 2016), i meccanismi molecolari coinvolti nella formazione della memoria sono inibiti da oTau extracellulare.

2.4.2 L'aumento dei livelli dell'NO attraverso un donatore di NO, DEA/NO, protegge contro la compromissione dell'LTP indotta da oTau

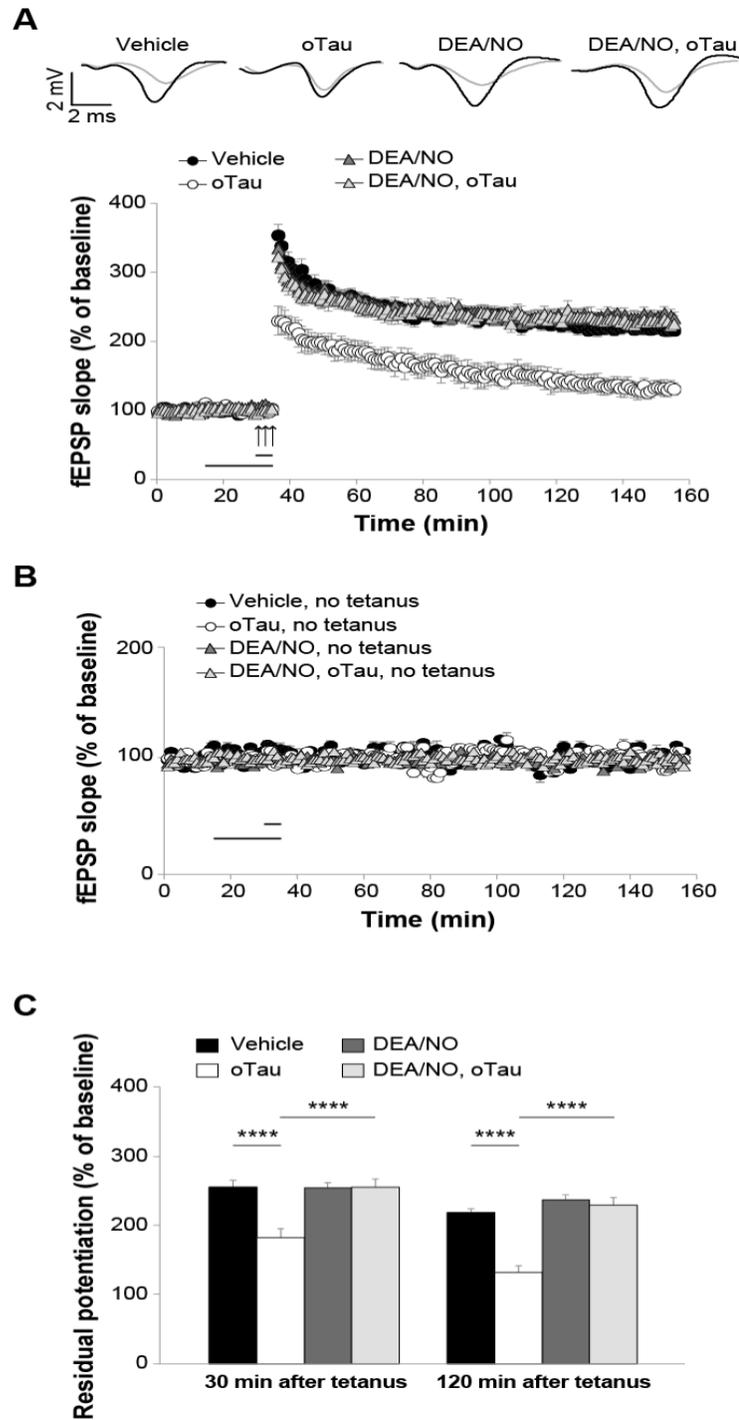


FIGURA 2. Miglioramento dell'LTP in seguito alla somministrazione di DEA/NO.

LTP è stata ottenuta da fette ippocampali derivate da topi perfusi per 20 minuti prima dell'induzione del tetano con oTau (100 nM) rispetto alle fettine trattate con veicolo ($n = 8/7$; ANOVA per misure ripetute: $F(1,19) = 30,859$, $p < 0,0001$). Una perfusione con DEA/NO (3 μM , 5 min) ha revertito l'effetto della LTP nelle fette con concomitante trattamento con oTau (100 nM, 20 min) negli esperimenti mostrati nella figura A ($n = 12$; ANOVA per misure ripetute: $F(1,23) = 31,208$, $p < 0,0001$ confronto di fette tetanizzate trattate con oTau + DEA/NO vs oTau). Nessuna differenza è stata trovata tra fette tetanizzate trattate con DEA/NO da sole ($n = 12$) e quelle trattate con DEA/NO+oTau ($F(1,26) = 0,052$, $p = 0,821$). Le fette trattate con

DEA/NO da solo non presentavano alcuna differenza con quelle trattate con veicolo (DEA/NO vs. veicolo: $F(1,22) = 0,155$, $p = 0,697$). Pannello superiore: tracce rappresentative di fEPSP prima (grigio) e dopo il tetano (nero) qui e in A.

B) La neurotrasmissione basale non è stata influenzata da oTau, DEA/NO o DEA/NO + oTau nelle fettine che non sono state tetanizzate rispetto alle fettine trattate con veicolo ($F(3,16) = 0,950$, $p = 0,440$; $n = 5$ fette da 5 animali, 3 maschi e 2 femmine per ogni condizione).

C) Quantificazione del potenziamento residuo a 30 e 120 minuti dopo il tetano (media degli ultimi 5 minuti registrati dai dati LTP mostrati in A e B). Veicolo: $n = 10$ fette/8 animali, 4 maschi e 4 femmine; oTau: $n = 11$ fette/8 animali, 4 maschi e 4 femmine; DEA/NO: $n = 14$ fette/12 animali, 6 maschi e 6 femmine; DEA/NO + oTau: $n = 14$ fette/11 animali, 6 maschi e 5 femmine. One way ANOVA: $F(3, 45) = 1,14$, $p < 0,0001$ a 30 minuti; $F(3,35) = 28,180$, $p < 0,0001$ a 120 min. Bonferroni test: $p < 0,0001$ tra oTau e le altre condizioni sperimentali a 30 minuti e 120 minuti. Le barre orizzontali indicano il periodo durante il quale i farmaci sono stati aggiunti alla soluzione nella cameretta, e le frecce indicano la consegna del tetano qui e nelle figure seguenti. **** $p < 0,0001$.

Dato che la fosforilazione della proteina CREB può essere migliorata attraverso l'up-regulation della cascata dell'NO, abbiamo determinato se un aumento dei livelli di NO è in grado di contrastare il difetto indotto da oTau nella LTP, un fenomeno cellulare che è probabilmente correlato con la memoria (Fá et al., 2016)(Lasagna-Reeves et al., 2012). Come precedentemente mostrato (Fá et al., 2016), LTP è stata evocata in fette di ippocampo esposte a oTau (100 nM) per 20 minuti prima della tetanizzazione rispetto alle fette trattate con veicolo (Figura 2A). Tuttavia, una breve perfusione di 5 minuti con il donatore di NO, 2-(N,N-dethylamino)-1-diazenolato-2-ossido sale di dietilammonio (DEA/NO), a una concentrazione di 3 μ M, è stata sufficiente per salvare le fettine dalla soppressione dell'LTP indotta da oTau (Figura 2A), senza influenzare la trasmissione basale nelle fettine non tetanizzate (Figure 2B). Inoltre, DEA/NO da solo non ha migliorato la LTP di per sé, né ha influito sulla neurotrasmissione basale durante la perfusione (Figura 2B). Queste fette hanno mostrato livelli simili di potenziamento come le fettine tetanizzate trattate con DEA/NO abbinato con oTau o con fettine trattate con veicolo sia a 30 minuti che a 120 minuti dopo il tetano (Figure C). Presi insieme, questi risultati dimostrano che l'NO protegge dall'inibizione dell'LTP indotta da oTau.

2.4.3 La sGC è coinvolta nell'effetto benefico dell'incremento dei livelli dell'NO contro la compromissione dell' LTP indotta da oTau.

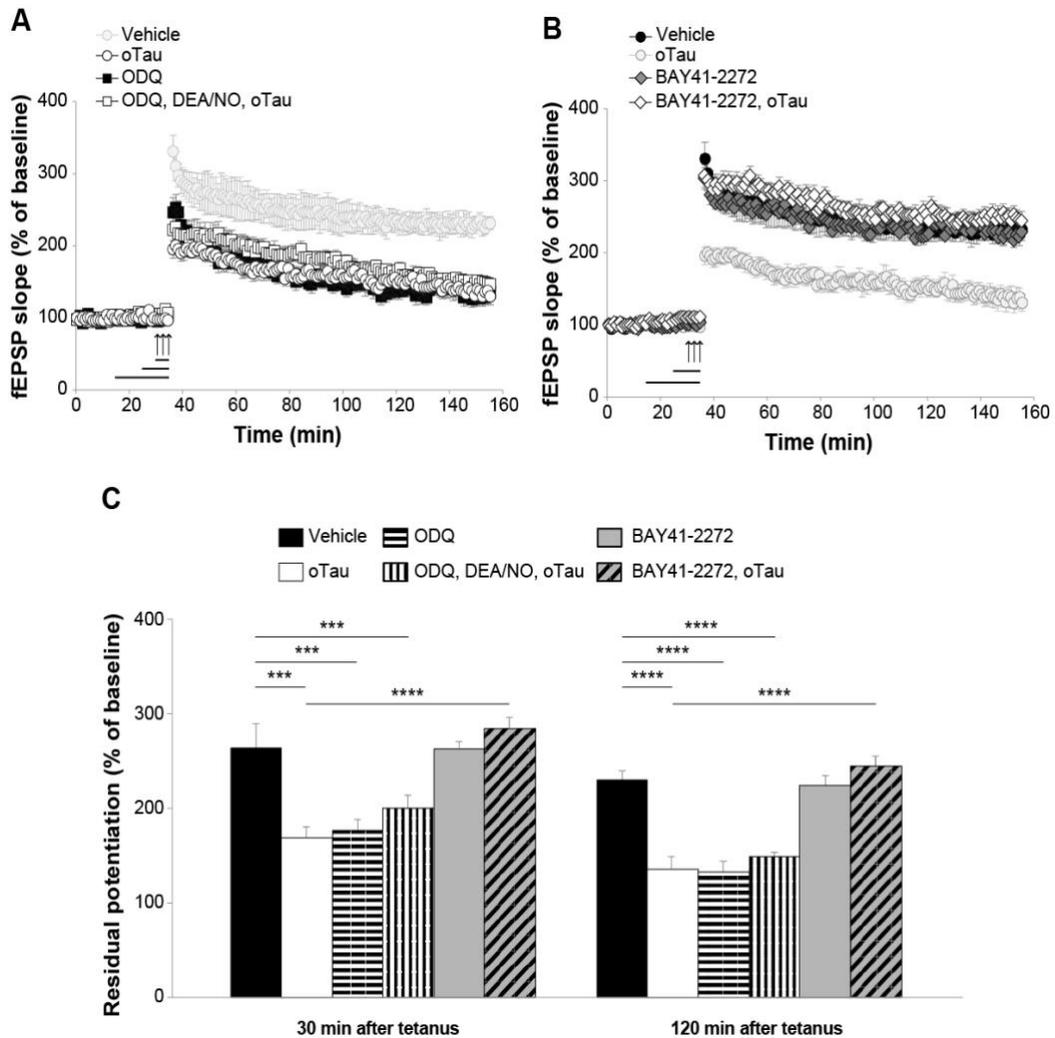


FIGURA 3. Ruolo protettivo dell'attivazione del sGT nella compromissione della LTP indotta da oTau.

A) L'ODQ, un inibitore delle sGC (10 μ M, 10 min), blocca il miglioramento indotto da DEA/NO (3 μ M, 5 min) della riduzione di LTP causato da oTau (100 nM, 20 min) (ANOVA: $F(1,20) = 2.346$, $p = 0.141$ confrontando ODQ + DEA/NO + oTau vs ODQ; $F(1,15) = 0,004$, $p = 0,954$ vs oTau). Il colore del gruppo veicoli è sfumato perché corrisponde allo stesso gruppo di B.

B) La perfusione con lo stimolatore della sGC BAY41-2272 (100 μ M, 10 min) salva la compromissione della LTP nelle fette in concomitanza al trattamento con oTau (100 nM, 20 min) in esperimenti intervallati con quelli mostrati nel pannello A (BAY41-2272 + oTau: $n = 11$; ANOVA: $F(1,17) = 78,187$, $p < 0,0001$ confrontati con BAY41-2272 + oTau vs. oTau). BAY41-2272 da solo non ha potenziato nulla (solo BAY41-2272: $n = 11$, vs veicolo: $n = 7$; $F(1,16) = 0.025$, $p = 0,877$). Nessune differenze significative sono state trovate tra le fette tetanizzate trattate BAY41-2272 + oTau o BAY41-2272 ($F(1,20) = 4.274$, $p = 0.052$ confrontato con BAY41-2272 + oTau con BAY41-2272). Il colore del gruppo oTau è sfumato perché corrisponde allo stesso gruppo di A.

C) Quantificazione dei potenziali misurati negli ultimi 5 minuti delle curve LTP mostrate in A e B a 30 e 120 minuti dopo il tetano. (Veicolo: $n = 7$ fette/7 animali, 3 maschi, 4 femmine; oTau da solo $n = 8$ fette/7 animali, 4 maschi, 3 femmine; ODQ: $n = 9$ fette/8 animali, 4 maschi, 4 femmine; + DEA/NO + oTau: $n = 13$ fette/11 animali, 6 maschi, 5 femmine; BAY41-2272: $n = 11$ fette/10 animali, 5 maschi, 5 femmine; BAY41-2272 + oTau: $n = 11$ fette/10 animali, 5 maschi, 5 femmine). ANOVA: $F(5,53) = 14,218$, $p < 0,0001$ a 30 minuti e $F(5,53) = 28,031$, $p < 0,0001$ a 120 minuti; Bonferroni test: $p < 0,0001$ e $p < 0,005$ tra

Veicolo e oTau o ODQ o ODQ + DEA/NO + oTau a 30 e 120 min, rispettivamente; $p < 0,0001$ tra oTau e oTau + BAY41-2272 a 30 e 120 min. *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$.

NO è una molecola di segnalazione che si lega e stimola le sGC (Schlossmann, Feil, & Hofmann, 2005). Le sGC, a sua volta, catalizzano la conversione del GTP in cGMP. Per indagare se la produzione del cGMP è necessaria affinché DEA/NO possa in qualche modo tamponare gli effetti che oTau ha sull'LTP, abbiamo trattato le fettine di ippocampo con 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one(ODQ), un inibitore irreversibile delle sGC sensibili al NO (Garthwaite et al., 1995). La perfusione con 10 μ M ODQ per 10 minuti prima della tetanizzazione impedisce l'effetto protettivo indotto da DEA/NO in coppia con 100 nM oTau per 20 minuti (Figura 3A). Inoltre, ODQ da solo ha ridotto LTP a livelli uguali a quelli ottenuti con oTau senza influenzare la trasmissione basale durante la perfusione (Figura 3A).

Il blocco dell'effetto positivo della somministrazione di DEA/NO contro il danno sull'LTP indotto da oTau da parte di ODQ è coerente con l'interpretazione che sGC ha un effetto benefico legato al pathway dell'NO. Tuttavia, in alternativa sono possibili altre spiegazioni, inclusa la possibilità che ODQ possa agire semplicemente distruggendo i meccanismi fisiologici necessari per supportare la LTP. Quindi, per definire direttamente se l'attivazione della sGC è a valle dei livelli di NO, negli esperimenti intervallati con quelli mostrati in Figura 3A, abbiamo perfuso fette di ippocampo con lo stimolatore della sGC 3-(4-amino-5-ciclopropilpirimidina-2-il)-1-(2-fluorobenzil)-1H-pirazolo [3,4-b] piridina(BAY41-2272), che bersaglia diverse isoforme di sGC senza influenzare l'attività di PDE (Koglin, Stasch, & Behrends, 2002). Quando BAY41-2272 (100 nM, 10 min) è associato ad oTau (100 nM, 20 min), la riduzione dell'LTP causata da oTau non era più presente (Figura 3B). BAY41-2272 (100 μ M) da solo, 10 min prima della tetanizzazione, non ha modificato il potenziamento, né la trasmissione basale (Figura 3B). Nessuna differenza significativa è stata trovata tra le fette tetanizzate trattate con BAY41-2272 in coppia con oTau rispetto alle fette trattate con BAY41-2272 da solo (Figura 3C). Complessivamente, questi risultati indicano che la stimolazione di sGC potrebbe svolgere un ruolo benefico contro la riduzione di LTP indotta dalla riduzione di oTau.

2.4.4/2.4.5 L'incremento dei livelli di cGMP protegge dalla riduzione di LTP indotta da oTau.

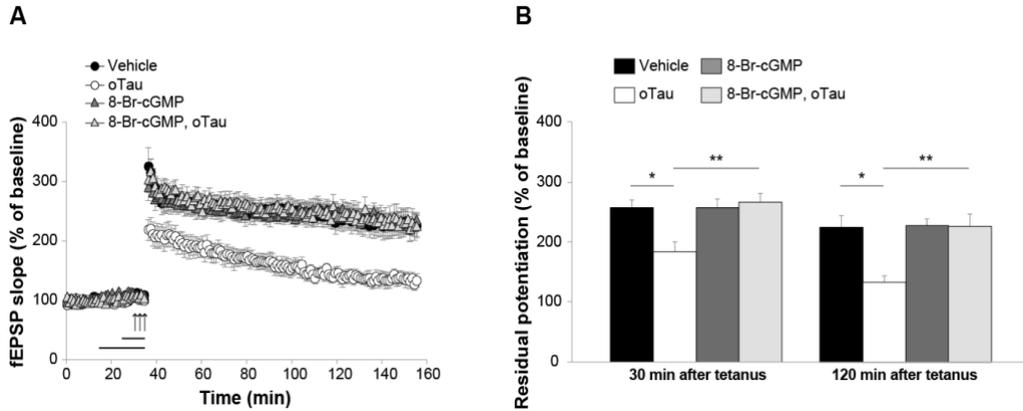


FIGURA 4. L'analogo del cGMP, 8-Br-cGMP, protegge la LTP dal peggioramento indotto da oTau.

A) La perfusione con 8-Br-cGMP (1 μ M, 10 minuti, n = 13) riporta alla normalità la riduzione di LTP indotta da oTau (100 nM, 20 min, n = 8; ANOVA per misure ripetute: $F(1,19) = 18,537$, $p < 0,0001$). 8-Br-cGMP da solo non modifica il potenziamento (n = 13 vs 7 in fette trattate con veicoli, $F(1,18) = 0,001$, $p = 0,974$ rispetto al veicolo). Nessuna differenza è stata trovata tra le fette tetanizzate trattate con 8-Br-cGMP e quelle trattate con 8-Br-cGMP + oTau ($F(1,24) = 0,065$, $p = 0,802$).

B) Il potenziamento residuo a 30 e 120 minuti dopo il tetano dai dati mostrati in A. (Veicolo: n = 8 fette/7 animali, 3 maschi e 4 femmine; oTau: n = 7 fette/7 animali, 3 maschi e 4 femmine; 8-Br-cGMP: 13 fette/11 animali, 6 maschi e 5 femmine; 8-Br-cGMP + oTau: 13 fette/11 animali, 5 maschi e 6 femmine). One-way ANOVA: $F(3,37) = 5,472$, $p = 0,003$ a 30 minuti e $F(3,37) = 6,670$, $p = 0,001$ a 120 minuti. Bonferroni test: $p = 0,038$ e $p = 0,011$ tra oTau e veicolo a 30 e 120 min, rispettivamente; $p = 0,003$ e $p = 0,002$ tra oTau e 8-Br-cGMP + oTau a 30 e 120 min, rispettivamente.

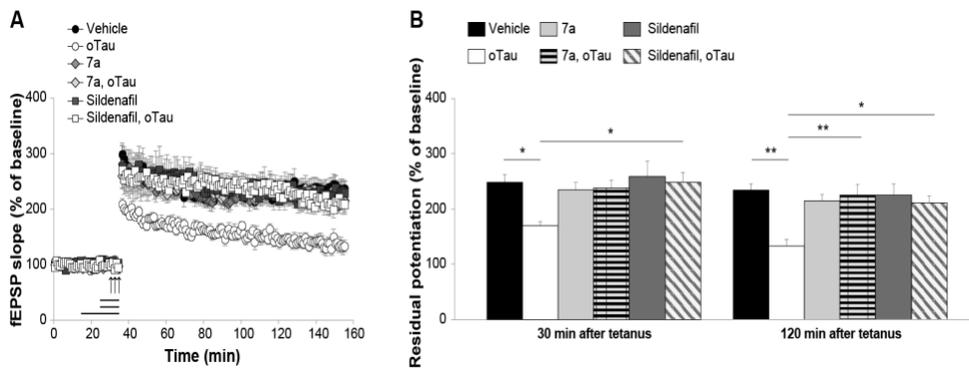


FIGURA 5. L'elevazione del cGMP attraverso l'inibizione della PDE5 protegge dall'indebolimento della LTP indotta da oTau.

A) La perfusione con il composto 7a (50 nM) o sildenafil (50 nM) per 10 min ha protetto le fette contro la compromissione della LTP in fette trattate con oTau (7a + oTau: n = 10; sildenafil + oTau: n = 11; oTau: n = 10; ANOVA per misure ripetute: $F(1,18) = 20,747$, $p < 0,0001$ e $F(1,19) = 34,688$, $p < 0,0001$ rispetto a fette trattate con oTau, rispettivamente). 7a o sildenafil da soli non hanno modificato il potenziamento (7a: n = 11; sildenafil: n = 11; veicolo: n = 9; $F(1,18) = 0,156$, $p = 0,697$ e $F(1,18) = 0,016$, $p = 0,900$). Non sono state trovate differenze significative tra le fette tetanizzate trattate con 7a e quelle

trattate con 7a + oTau ($F(1,19) = 0,060$, $p = 0,809$) e tra quelle tetanizzate trattate con sildenafil rispetto a quelle trattate con sildenafil + oTau ($F(1,20) = 0,013$, $p = 0,910$).

B) Potenzamento residuo a 30 e 120 min dopo il tetano dai dati riportati in A (Veicolo: $n = 9$ fette/9 animali, 5 maschi e 4 femmine; oTau: $n = 10$ fette/7 animali, 3 maschi e 4 femmine; 7a : 11 fette/9 animali, 4 maschi e 3 femmine; 7a + oTau: 10 fette/10 animali, 5 maschi e 5 femmine; sildenafil: 11 fette/10 animali, 5 maschi e 5 femmine; sildenafil + oTau: 11 fette/9 animali, 5 maschi e 4 femmine). One-way ANOVA: $F(5,56) = 3,44$, $p = 0,009$ a 30 minuti e $F(5,56) = 5,673$, $p < 0,0001$ a 120 minuti. Bonferroni test: $p = 0,04$ ep = 0,001 tra oTau e veicolo a 30 e 120 min, rispettivamente; $p = 0,002$ tra oTau e 7a + oTau a 120 min; $p = 0,03$ ep = 0,01 tra oTau e sildenafil + oTau a 30 e 120 min, rispettivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Si sa che la sGC media l'LTP e la formazione della memoria attraverso l'aumento dei livelli di cGMP intracellulare (Garthwaite et al., 1995). Quindi, abbiamo ipotizzato che la somministrazione di analoghi del cGMP potrebbero proteggere dalla compromissione della LTP indotta da oTau. Abbiamo utilizzato il composto 8-Br-cGMP, un analogo del cGMP permeabile che attiva specificamente PKG a basse concentrazioni (K_a , 0,01-0,21 μM per PKG, 12 μM per PKA) (Butt et al., 1992)(Sekhar et al., 1992). Quando le fette di ippocampo sono state perfuse con oTau (100 nM, 20 min) accoppiato con 8-Br-cGMP per 10 min (1 μM) prima del tetano, la LTP non era più ridotta (Figura 4A-B). Inoltre, la protezione non era causata da un effetto dell'8-Br-cGMP sulla LTP, perché la perfusione con l'analogo da solo non migliorava la quantità di potenziamento (Figura 4A-B). Infine, 8-Br-cGMP da solo non influenza la trasmissione basale durante la perfusione (Figura 4A-B).

Il livello del cGMP viene mantenuto attraverso un equilibrio tra la sua produzione, catalizzato da sGC, e il suo degrado, catalizzato da PDE. Perciò, un'altra strategia per aumentare il livello di cGMP consiste nell'utilizzare inibitori della PDE. In particolare, abbiamo usato due inibitori della PDE5, sildenafil e composto 7a. Il sildenafil è un inibitore della PDE5 ben noto e ampiamente studiato con un IC_{50} di 6,0 nM e emivita, *in vivo*, di 0,4 ore nei roditori (~4 ore nell'uomo). Tuttavia, il rapporto di selettività per PDE1 e PDE6 è 180 e 12, rispettivamente (Corbin & Francis, n.d.). Il composto 7a possiede una maggiore selettività per PDE5 ($PDE5/PDE6 > 1000$) con un IC_{50} di 0,27 nM ed un'emivita plasmatica di 1,33 ore nei roditori (Fiorito et al., 2013). Abbiamo trovato che una perfusione di 10 minuti con il sildenafil (50 nM) in presenza di oTau ha neutralizzato la riduzione della LTP (Figura 5 A-B). Allo stesso modo, una perfusione per 10 min, con il 7a (50 nM) ha protetto contro il difetto di LTP indotto da oTau (Figura

5A-B). Questo fenomeno non può essere attribuito ad un effetto dell'inibizione della PDE5 sulla LTP di per sé, poiché la perfusione con sildenafil o 7a da solo non ha influenzato la quantità di potenziamento, né un effetto sulla neurotrasmissione basale poiché i due inibitori non hanno influenzato la trasmissione basale delle sinapsi durante la perfusione (Figura 5A). Complessivamente, questi esperimenti suggeriscono che l'incremento dei livelli di cGMP protegge contro l'inibizione della LTP da α Tau.

2.4.6 L'attivazione di PKG contrasta la compromissione della LTP delle fette indotta da oTau.

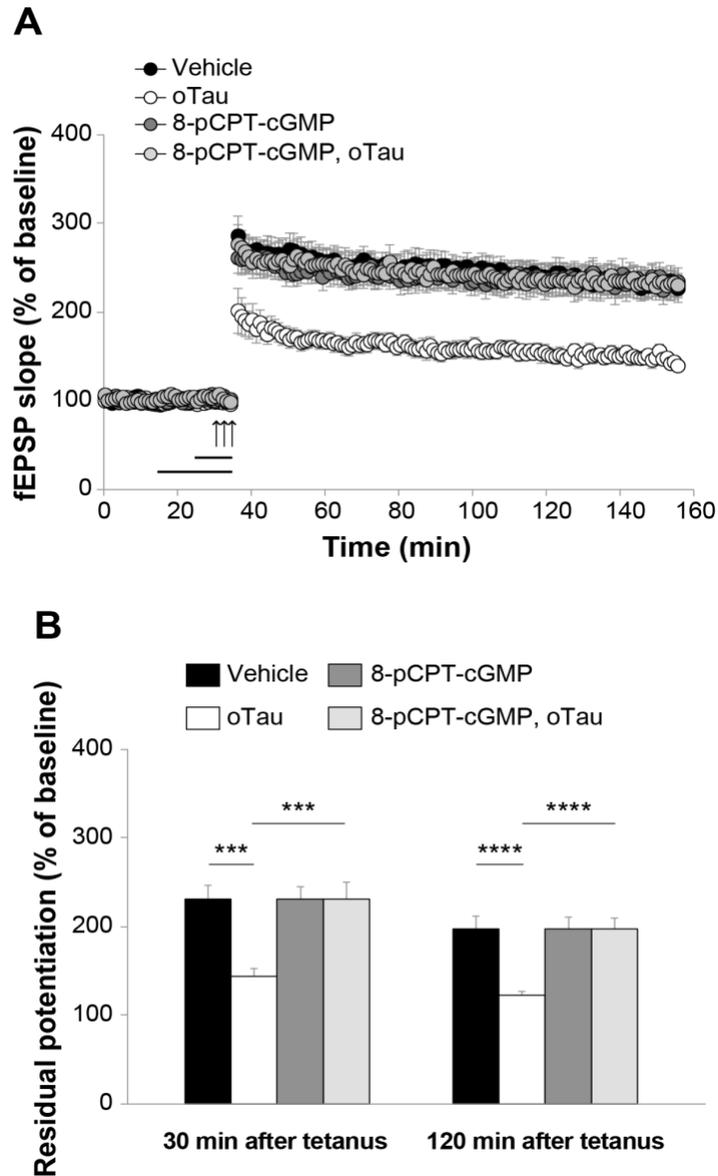


Figura 6. Ruolo della PKG.

A) Perfusion per 10 minuti con 8-pCPT-cGMP (1 μ M) prima dell'induzione di LTP. Il composto protegge contro la riduzione della LTP indotta da oTau (n = 10; ANOVA per misure ripetute: $F(1,19) = 24,037$, $p < 10,0001$ rispetto a fette perfuse con oTau). La perfusione con oTau 20 minuti prima della tetanizzazione mostra una LTP diminuita (oTau: n = 10; veicolo: n = 11; $F(1,19) = 26,310$, $p = 0,0001$ confrontando oTau vs veicolo), mentre 8-pCPT-cGMP da solo non ha influenzato il potenziamento (n = 11; $F(1,20) = 0,100$, $p = 0,755$, rispetto al veicolo).

B) Quantificazione del potenziamento residuo a 30 e 120 min dalle curve LTP mostrate in A. (Veicolo: n = 11 fette/11 animali, 5 maschi e 6 femmine; oTau: n = 10 fette/9 animali, 5 maschi e 4 femmine; 8-pCPT-cGMP: 11 fette/10 animali, 5 maschi e 5 femmine; 8-pCPT-cGMP + oTau: 10 fette/10 animali, 5 maschi e 5 femmine). One-way ANOVA: $F(3,38) = 8,496$, $p < 0,0001$ a 30 minuti e $F(3,38) = 9,964$, $p < 0,0001$ a

120 minuti; Bonferroni test: $p = 0,001$ ep $<0,0001$ tra oTau e Vehicle o oTau + 8-pCPT-cGMP a 30 min e 120 min, rispettivamente. *** $p <0,005$, **** $p <0,0001$.

La PKG è attivata dal cGMP. Abbiamo pertanto utilizzato l'attivatore specifico per PKG, l'8-pCPT-cGMP, per determinare se l'attivazione della chinasi protegge contro la compromissione della LTP indotta da tau. Questo composto ha una maggiore lipofilia e permeabilità della membrana rispetto a 8-Br-cGMP ed è selettivo per l'attivazione di due isoforme della PKG, PKGI (K_a di $0,05 \mu\text{M}$) e PKGII (K_a di $0,0035\text{-}0,08 \mu\text{M}$) rispetto ad altri obiettivi della cGMP come PDE (Geiger, Nolte, Butt, Sage, & Walter, 1992). Inizialmente, abbiamo confermato che 20 min di perfusione con 100 nM di oTau bloccano l'LTP (Figura 6A-B). 10 minuti di perfusione con 8-pCPT-cGMP ($1 \mu\text{M}$) prima del potenziamento, alla presenza di oTau, aboliscono la riduzione della LTP. Il fenomeno non può essere attribuito a un effetto di attivazione della PKG su LTP di per sé, poiché la perfusione con 8-pCPT-cGMP da sola non ha influenzato la quantità del potenziamento (Figura 6A-B), né a un effetto sulla neurotrasmissione basale poiché l'attivatore non ha influenzato la trasmissione sinaptica basale durante la perfusione (Figura 6A). Complessivamente, questi esperimenti suggeriscono che l'attivazione della PKG protegge contro l'inibizione di LTP indotta da oTau.

2.4.7 L'aumento dei livelli di cGMP e l'attivazione della PKG migliorano il danno della memoria indotto da oTau nei topi.

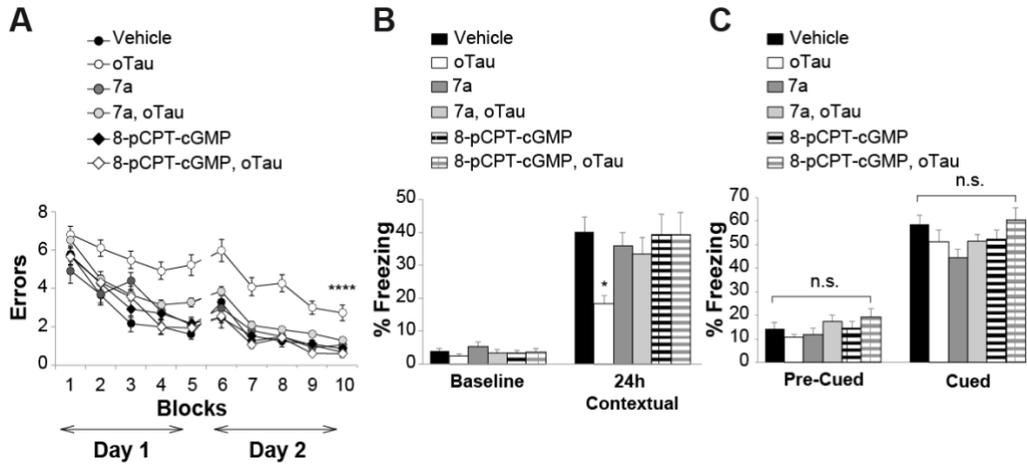


FIGURA 7. L'aumento dei livelli di cGMP migliora le funzionalita' della PKG nella riduzione di LTP indotta da oTau.

A) L'inibitore della PDE5, il 7a (3 mg/kg, i.p.) o l'attivatore della PKG 8-pCPT-cGMP (40 µg/Kg, i.p) proteggono contro gli effetti deleteri dell'oTau ((22,95 µg/ml) sulla prestazione nella RAWM. ANOVA per misure ripetute (giorno 2): ($F(5,83) = 17,973$, $p < 0,0001$). One-way ANOVA per blocco 10: $F(5,83) = 9,016$, $p < 0,0001$; Bonferroni test $p < 0,0001$ oTau contro veicolo o oTau + 8-pCPT-cGMP, $p = 0,003$ vs oTau + 7a. Da soli, 7a o 8-pCPT-cGMP non modificano la memoria (Bonferroni test $p = 1$ rispetto al veicolo, blocco 10). Veicolo: $n = 15$ 8 maschi, 7 femmine, oTau: $n = 17$, 9 maschi e 8 femmine, oTau + 7a: $n = 16$ 8 maschi, 8 femmine, oTau + 8-pCPT-cGMP: $n = 14$, 7 maschi e 7 femmine, 7a: $n = 14$, 7 maschi e 7 femmine, 8-pCPT-cGMP: $n = 13$, 6 maschi e 7 femmine.

B) Il 7a (3 mg/kg) o 8-pCPT-cGMP (40 µg/Kg) proteggono contro l'alterazione indotta da oTau- (22,95 µg/ml) nei test di memoria contestuale, senza modificare la memoria di per sé [24 ore: ANOVA $F(5,83) = 2,699$, $p = 0,026$; Bonferroni test: veicolo contro oTau: $p = 0,036$; veicolo contro oTau + 7a o oTau + 8-pCPT-cGMP o 7a o 8-pCPT-cGMP: $p = 1$]. Non ci sono differenze rilevanti nei movimenti del topo prima dello shock elettrico (ANOVA tra tutti: $F(5,83) = 0,978$, $p = 0,436$). Veicolo: $n = 16$, 8 maschi e 8 femmine, oTau: $n = 14$, 7 maschi e 7 femmine, oTau + 7a: $n = 17$, 9 maschi e 8 femmine, oTau + 8-pCPT-cGMP: $n = 14$, 7 maschi e 7 femmine, 7a: $n = 15$, 8 maschi e 7 femmine, 8-pCPT-cGMP: $n = 13$, 6 maschi e 7 femmine.

C) Il "freezing" prima (Pre) e dopo (Post) sono gli stessi tra i sei gruppi mostrati in B nel test di condizionamento in cued. ANOVA: Pre-indotto: $F(5,83) = 1,223$, $p = 0,306$; Citato: $F(5,83) = 2,010$, $p = 0,086$.

Poichè gli esperimenti con la LTP indicano che l'up-regulation della cascata del NO migliora la riduzione della memoria indotta da oTau, abbiamo cercato di estrapolare questi risultati alla memoria usando il composto 7a e 8-pCPT-cGMP per elevare i livelli di cGMP e attivare la PKG. All'inizio abbiamo esaminato la memoria spaziale usando la RAWM. L'obiettivo del test è quello di indagare sulla memoria di riferimento a breve termine (Alamed, Wilcock, Diamond, Gordon, & Morgan, 2006). Sulla base di studi precedenti (Fá et al., 2016), o-Tau (22,95 µg/ml) è stato somministrato attraverso cannule

intra-ippocampali 180 e 20 minuti prima dell'allenamento. Il composto 7a (3 mg/Kg) e 8-pCPT-cGMP (40µg/Kg) sono stati dati per via i.p. dopo il 2 °, 4 °, 7 ° e 9 ° blocco di prove. Per prima cosa hanno confermato che la somministrazione di oTau ha ridotto significativamente la memoria spaziale (Figura 7A). La somministrazione del composto 7a o del 8-pCPT-cGMP inducono un miglioramento nel declino cognitivo indotto da oTau, dal momento che le prestazioni dei topi assomigliavano a quelle dei topi trattati con il veicolo (Figura 7A). Inoltre, la somministrazione del composto 7a o 8-pCPT-cGMP da soli non ha migliorato le prestazioni della memoria negli animali trattati con il veicolo (Figura 7A). Gli esperimenti di controllo con il test della piattaforma visibile hanno escluso che i risultati di questi esperimenti fossero influenzati da un effetto visivo, motorio e motivazionale, poiché i diversi gruppi hanno mostrato una simile velocità e un simile tempo di nuoto per trovare la piattaforma quando visibile. (Figura 9) Pertanto, l'attivazione di PKG è vantaggiosa contro la compromissione della memoria spaziale indotta da oTau.

Successivamente, abbiamo esaminato l'effetto del composto 7a e 8-pCPT-cGMP sulla memoria contestuale indotta dalla paura. Questo compito dipende dall'ippocampo e dall'amigdala (R. G. Phillips & LeDoux, 1992) e valuta la memoria associativa, un tipo di memoria che è affetta nei pazienti con AD. Abbiamo usato la stessa concentrazione di oTau e dei farmaci come per gli esperimenti di RAWM fatti precedentemente. I topi sono stati iniettati con oTau (180 min e 20 minuti prima della sessione di allenamento del primo giorno) e 7a o 8-pCPT-cGMP subito dopo l'allenamento. Non c'era alcuna differenza significativa tra i gruppi durante la registrazione di base (Figura 6B). Tuttavia, come precedentemente dimostrato (Fá et al., 2016), la somministrazione di oTau interferiva con la formazione della memoria, dal momento che i topi non hanno ricordato il contesto in cui hanno ricevuto lo shock a distanza di 24 ore (Figura 7B). La somministrazione del composto 7a o 8-pCPT-cGMP migliora i danni alla memoria contestuale causati da oTau (Figura 7B). I composti 7a o 8-pCPT-cGMP non hanno modificato la memoria di per sé, in quanto non ci sono differenze significative nel “freezing” degli animali trattati con veicolo o in quelli trattati con il composto 7a o 8-pCPT-cGMP da soli (Figura 7B).

Abbiamo anche esaminato il condizionamento della paura, che è un compito dipendente dall'amigdala e indipendente dall'ippocampo (R. G. Phillips & LeDoux, 1992), senza trovare differenze tra i gruppi prima o dopo lo stimolo (Figura 6C). Il test di controllo ha dimostrato che i diversi trattamenti non cambiano la percezione del dolore, come determinato attraverso la valutazione della soglia sensoriale (Figura 9). Infine, la somministrazione di oTau, 7a o 8-pCPT-cGMP non influenza l'attività esplorativa, la funzione locomotoria e l'ansia, valutate dal test in campo aperto (figura 9). Complessivamente, questi risultati indicano che l'up-regulation della cascata di NO potrebbe migliorare la perdita di memoria indotta da oTau.

2.4.8 L'inibizione di PDE5 migliora la riduzione dei livelli di pCREB e cGMP indotta da oTau dopo l'induzione della memoria.

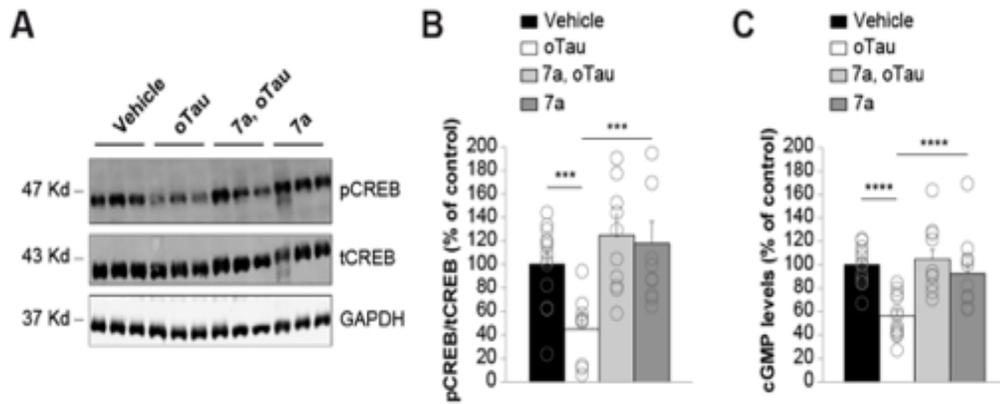


FIGURA 8 L'inibizione della PDE5 ristabilisce i livelli normali di pCREB e cGMP dopo la scarica elettrica in presenza di oTau.

A) Immunoblots eseguiti su ippocampi raccolti a 1 minuto dopo lo shock elettrico.

B) Il grafico a barre mostra che oTau riduce significativamente l'espressione di pCREB, mentre un trattamento concomitante con l'inibitore PDE5, il 7a, è in grado di ristabilire l'espressione normale di pCREB. Viene visualizzato il rapporto medio di p-CREB/t-CREB (One-way ANOVA: $F(3,45) = 6,166$; $p = 0,001$; post-hoc di Bonferroni: $p = 0,045$ tra veicolo e oTau; $p = 0,002$ tra oTau e oTau + 7a). L'espressione di GAPDH è stata utilizzata come controllo del caricamento. Veicolo: $n = 14$; oTau $n = 9$; oTau + 7a $n = 12$; 7a $n = 14$.

C) Il grafico a barre mostra che oTau riduce significativamente il livello di cGMP, mentre un trattamento concomitante con l'inibitore PDE5, il 7a, è in grado di ristabilire i livelli normali di cGMP (One-way ANOVA: $F(3,41) = 9,643$; $p < 0,0001$; Post-hoc Bonferroni: $p < 0,0001$ tra veicolo e ouau e tra oTau e ouau + 7a). Veicolo: $n = 12$; oTau $n = 12$; oTau + 7a $n = 10$; 7a $n = 11$.

Per determinare se gli effetti benefici dell'inibizione della PDE5 sulla formazione della memoria avvengano attraverso un'azione contro la riduzione di pCREB dopo l'esposizione a oTau, abbiamo valutato l'effetto dell'elevazione dei livelli di cGMP e di pCREB in presenza del composto 7A (l'inibitore della PDE5). Come mostrato nella Figura 8A, abbiamo trovato che l'infusione di oTau nella parte dorsale dell'ippocampo (500 nM, 1 μ l per lato) 180 e 20 minuti prima dello footshock riduceva i livelli di pCREB (Figura 8A-B). Tuttavia, la somministrazione dell'inibitore della PDE5, il 7a (3 mg/kg, iniettato per via endovenosa 30 minuti prima dello shock alla zampa) ha protetto contro l'effetto negativo di oTau sui livelli di pCREB (Figura 8A-B).

Per indagare ulteriormente il legame tra la cascata del NO e la compromissione tau-indotta nella fosforilazione di LTP, memoria e CREB, ci siamo successivamente chiesti

se oTau interferisca direttamente con la cascata bloccando l'aumento del cGMP che si verifica normalmente subito dopo lo shock elettrico [55]. Abbiamo riscontrato che l'infusione di oTau nella parte dorsale dell'ippocampo (500 nM, 1 μ l per lato), a 180 e 20 minuti prima dello footshock, riduceva i livelli del cGMP (Figura 8C). Tuttavia, la somministrazione dell'inibitore della PDE5, il 7a (3 mg/kg, iniettata i.p. 30 minuti prima dello footshock), ha migliorato il deficit nei livelli di cGMP (Figura 8C). Complessivamente, questi risultati indicano che oTau riduce i livelli di cGMP dopo la scossa elettrica. Inoltre, l'inibizione della PDE5 può proteggere dalla riduzione indotta da oTau nei livelli di pCREB e cGMP dopo l'induzione della memoria.

2.4.9 L'incremento dei livelli di cGMP protegge contro il blocco dell'incremento della fosforilazione di CREB associata alla stimolazione tetanica.

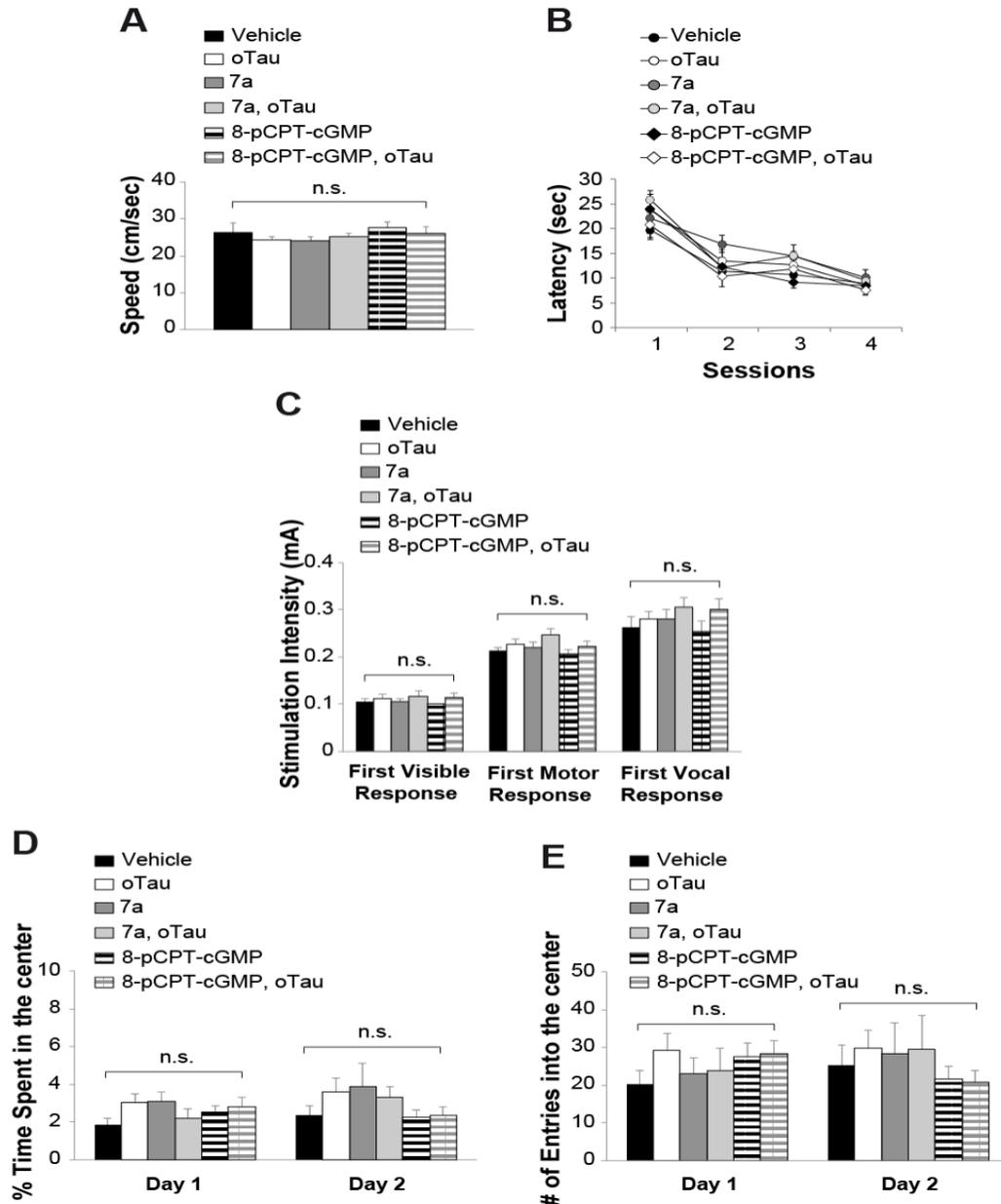
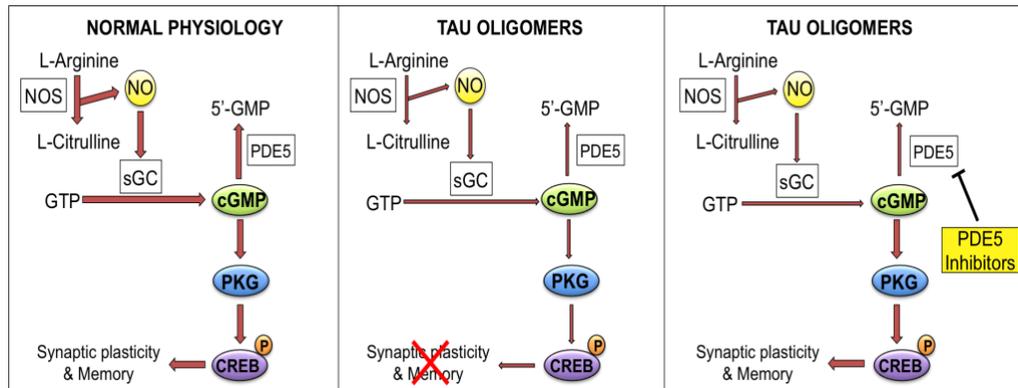


Figura 9 - L'elevazione del cGMP non influenza il comportamento motorio, visibile o esplorativo nei topi trattati con oTau. AB) Test con piattaforma visibile per la valutazione dei deficit di motivazione visiva-motoria per gli animali mostrati nella Figura 8A. Il test non ha rivelato alcuna differenza nella velocità media (ANOVA: $F(5,83) = 0,570, p = 0,723$) (A) e nel tempo per raggiungere la piattaforma visibile (ANOVA per misure ripetute: $F(5,83) = 1,204, p = 0,297$) (B) tra i sei gruppi. C) Nessuna differenza è stata rilevata tra i gruppi della Figura 8B, C

durante la valutazione della soglia sensoriale. ANOVA: per la risposta visibile $F(5,83) = 0,683$, $p = 0,637$; per la risposta del motore $F(5,83) = 1,775$, $p = 0,131$ e per la risposta udibile $F(5,83) = 0,933$, $p = 0,464$. DE) Il test in open field ha mostrato una percentuale simile di tempo trascorso nel compartimento centrale ($F(5,83) = 7,037$, $p = 0,407$) (D) e il numero di voci nel compartimento centrale ($F(5,81) = 0,297$, $p = 0,850$) (E) tra tutte le condizioni al giorno 2, indicando assenza di differenze nel comportamento esplorativo. Veicolo: $n = 15$, 8 maschi, 7 femmine, oTau: $n = 16$, 8 maschi, 8 femmine, oTau + 7a: $n = 17$, 8 maschi, 9 femmine, oTau + 8-pCPT-cGMP: $n = 14$, 7 maschi, 7 femmine, 7a: $n = 12$, 6 maschi, 6 femmine, 8-pCPT-cGMP: $n = 13$, 7 maschi, 6 femmine.

2.4.10 Effetti di oTau sul pathway dell'NO.



Il pannello sinistro mostra la cascata in condizioni fisiologiche. NO è prodotto dall'enzima ossido nitrico sintasi (NOS) che converte la L-arginina in L-citrullina. NO attiva la guanilil ciclasti solubile (sGC), che produce guanosina monosfosfato ciclico (cGMP) dalla guanosina trifosfato (GTP). Il cGMP viene degradato in 5'-GMP da fosfodiesterasi 5 (PDE5). L'aumento dei livelli di cGMP attiva la protein chinasi cGMP-dipendente (PKG), che induce la fosforilazione di CREB e l'aumento della plasticità e della memoria sinaptica. In presenza di oTau (pannello centrale), la fosforilazione di CREB viene ridotta, con una riduzione dell'attivazione della cascata (mostrata da frecce più strette), portando a una compromissione della plasticità sinaptica e dei processi di memoria. Il trattamento con inibitori della PDE5 (pannello di destra) ristabilisce i livelli normali di cGMP, portando ad una aumentata fosforilazione del CREB e alla normale plasticità sinaptica e memoria.

2.5 Discussione

Nel presente studio, riportiamo gli effetti della sovraregolazione della cascata del NO sulla compromissione dell'LTP e della memoria indotta da oTau. L'osservazione iniziale che ha ispirato questo lavoro è stata la scoperta che l'aumento della fosforilazione del CREB durante la formazione della memoria è soppresso negli animali esposti a oTau. Questo risultato è coerente con l'osservazione che anche i livelli di acetilazione di H3K27 sono ridotti dall'esposizione di oTau durante la formazione della memoria. Infatti, la proteina CREB si lega alla proteina dell'istone acetiltransferasi CREB-binding (CBP) (Teich et al., 2015)(Perissi et al., 1999), portando ad un aumento dei livelli di acetilazione di H3 e H4 durante l'apprendimento spaziale e associativo nell'ippocampo e nella corteccia. Come numerosi studi hanno dimostrato, la fosforilazione di CREB promuove la trascrizione di geni di memoria come cFos, BDNF-IV, EGR1, Arc e Nr4a1 e Nr4a2 che sono fondamentali nel processo di formazione della memoria (Hawk & Abel, 2011) (Dragunow, 1996) (Heroux et al., 2018). Confermiamo ora questi dati dimostrando che la riduzione della fosforilazione di CREB in presenza di oTau è associata a un'espressione ridotta dei geni c-Fos e Arc. Oltre a queste osservazioni, uno studio recente ha suggerito che tau è un gene bersaglio di CREB e ne regola negativamente la trascrizione (H. Liu et al., 2015). Inoltre, la sovraespressione di CREB ha ridotto significativamente i livelli di mRNA di tau agendo sul sito CRE1 del promotore tau per inibire la trascrizione del gene tau (H. Liu et al., 2015). Altri studi hanno dimostrato una relazione simile tra pCREB e tau. Ad esempio è stato osservato che la sovraregolazione dell'espressione di CREB e pCREB attenua il livello di tau iperfosforilata nei neuroni ischemici della corteccia parietale nei cervelli di ratto (Z.-H. Zhang et al., 2010). Inoltre, è stato dimostrato che il pathway di segnalazione tau/Fyn/NR2B potrebbe interferire con l'attività e l'espressione di CREB (Xie et al., 2017). Le proteine tau post-tradotte e iperfosforilate causano una riduzione e un fallimento dell'attività e della fosforilazione di Fyn (tirosin protein kinase), NR2B (unità recettrice del recettore NMDA) e CREB. La compromissione della fosforilazione di CREB da parte di oTau ci ha portato ad ipotizzare che l'up-regolazione del pathway NO/cGMP/PKG/CREB, che è noto interferire con CREB, possa essere benefico nell'AD. Per indagare la nostra ipotesi e fornire nuove informazioni sui meccanismi molecolari alla base di difetti dell'apprendimento e della memoria indotti da

oTau, abbiamo esaminato i singoli componenti della via di segnalazione NO/cGMP/PKG/CREB in relazione all'elevazione dei livelli di oTau nell'ippocampo di topo.

In primo luogo abbiamo studiato l'effetto di NO sulla riduzione della LTP causata da oTau attraverso il donatore di NO, DEA/NO. I nostri risultati hanno suggerito che l'aumento di NO è in grado di salvare dalla compromissione della LTP, fornendo la prova che il NO ha un effetto protettivo sul rafforzamento sinaptico e corroborando altri studi che dimostrano che il NO è coinvolto nei processi di plasticità dell'ippocampo (O'Dell, Hawkins, Kandel, & Arancio, 1991) (Schuman & Madison, 1991) (Böhme et al., 1991). Tuttavia, il ruolo di NO è controverso in quanto diversi studi hanno dimostrato che il NO è sia neuroprotettivo che neurotossico. Il NO è stato correlato con le malattie neurodegenerative attraverso la formazione di specie reattive dell'azoto (Zhao, Yu, & Tan, 2015), ma è stato di conseguenza dimostrato che il NO è in grado di ridurre la patologia tau e diminuire la perdita cellulare, agendo come punto di giunzione tra peptidi A β , attivazione della caspasi e aggregazione di tau (Colton et al., 2006). Di fondamentale importanza è da quale molecola viene prodotto il NO che ne attribuisce un ruolo, positivo o negativo, nell'AD. Il NO neurotossico è prodotto dalla NOS inducibile dalla microglia (iNOS) che causa disfunzione sinaptica attraverso la produzione di perossinitrito [68-70]. Il NO prodotto dalle altre isoforme, la NOS endoteliale (eNOS) e/o la NOS neuronale (nNOS) sembrano essere collegate a meccanismi neuroprotettivi (Law, O'Donnell, Gauthier, & Quirion, 2002). È interessante notare che un recente studio ha esaminato il ruolo controverso del NO e dei suoi effetti sulla plasticità sinaptica nei topi 3xTg-AD. Questi modelli animali mostrano spesso evidenza di plasticità sinaptica disfunzionale regolata dal calcio prima che si verifichi l'insorgenza di deficit cognitivi, suggerendo quindi che deve esserci un meccanismo di compensazione che permetta all'ippocampo di mantenere la sua normale produzione, mentre c'è già evidenza di disfunzione sinaptica (Chakroborty, Kim, Schneider, West, & Stutzmann, 2015). Il lavoro ha suggerito che esiste una relazione tra l'aumento del rilascio di calcio osservato nei topi AD pre-sintomatici e NO, dal momento che il NO è regolato con il calcio. Il blocco della sintesi di NO ha provocato una depressione sinaptica marcatamente aumentata nei topi

AD. Questo spiegherebbe perché i modelli di topi AD e i pazienti AD hanno livelli elevati di nNOS e recettori della rianodina (Law et al., 2002) (Chakroborty et al., 2012) (Lüth, Münch, & Arendt, 2002), come se si instaurasse un meccanismo per aumentare la cascata di NO per compensare la disfunzione sinaptica sperimentata. Negli stadi successivi dell'AD, i livelli cumulativi di NO raggiungono un livello di neurotossicità e convertono il ruolo del gas da neuroprotettivo a neurotossico, dimostrando che il NO agisce come una molecola tipo Jekyll-Hyde a seconda delle sue concentrazioni (Chakroborty et al., 2012).

Per valutare gli effetti a valle del NO abbiamo usato l'ODQ, un inibitore irreversibile della sGC, che è in grado di ridurre i livelli di LTP a partire da fette ippocampali perfuse con tau. Ancora più importante, l'associazione di oTau con ODQ e DEA/NO ha bloccato il ruolo neuroprotettivo del donatore di NO supportando la precedente evidenza che la sGC è un fattore importante nella via del segnale del NO coinvolto nel salvataggio dalla disfunzione sinaptica (Puzzo et al., 2005) (Schlossmann, Feil, & Hofmann, 2003). Per escludere la possibilità che ODQ abbia potuto interrompere altri meccanismi coinvolti nell'induzione di LTP, abbiamo usato una strategia alternativa per indagare l'importanza del sGC nel salvataggio del deficit sinaptico indotto da oTau. Abbiamo utilizzato lo stimolatore del sGC, il BAY41-2272 e ottenuto risultati simili a quelli trovati con DEA/NO, cioè il BAY41-2272 è stato in grado di ristabilire la normale LTP dopo l'esposizione a oTau. È interessante notare che nei pazienti con AD sono stati riscontrati livelli di attività della sGC circa il 50% in meno dei controlli nella corteccia temporale superiore (Bonkale et al., 1995). Queste osservazioni forniscono la prova che sGC è molto importante per la cascata del NO e svolge un ruolo diretto nell'eziopatologia dell'AD. Pertanto, le nostre scoperte sull'attivazione della sGC e il danno indotto da oTau su LTP e sulla memoria sono coerenti con questo scenario.

Dato che la sGC è responsabile della produzione di cGMP da GTP (Schlossmann et al., 2003), abbiamo ipotizzato che l'aumento dei livelli di cGMP sarebbe vantaggioso e contrasterebbe la compromissione della LTP indotta da oTau. In accordo con la nostra ipotesi, entrambi gli analoghi del cGMP, 8-Br-cGMP e 8-pCPT-cGMP, hanno migliorato

l'alterazione sinaptica indotta da oTau portandola a livelli fisiologici normali. Inoltre, abbiamo osservato che la LTP alterata da oTau viene ripristinata dopo perfusione delle fettine di ippocampo con due inibitori della PDE5, sildenafil e il composto 7a, che elevano i livelli di cGMP.

Vari enzimi fosfodiesterasici sono in grado di idrolizzare il cGMP regolandone i livelli intracellulari. Noi e altri gruppi abbiamo evidenziato l'importanza della PDE5 nel modulare la via di trasduzione del segnale NO-cGMP, e quindi il suo effetto sulla plasticità sinaptica e sulla memoria (Fiorito et al., 2013) (Puzzo et al., 2009) (Devan et al., 2014) (Rutten et al., 2009) (Prickaerts et al., 2002). In precedenza abbiamo riferito che la somministrazione di inibitori della PDE5, il sildenafil e il composto 7a, in un modello murino di deposizione di amiloide non solo hanno aumentato i livelli di cGMP ma hanno anche esercitato un miglioramento immediato e duraturo della funzione sinaptica e della memoria (Fiorito et al., 2013) (Puzzo et al., 2009). Tuttavia, un possibile punto di contesa potrebbe riguardare l'effettiva efficacia degli inibitori della PDE5 sul miglioramento degli aspetti cognitivi, poiché il loro effetto potrebbe essere attribuito all'aumento del flusso sanguigno e al metabolismo del glucosio (come menzionato sopra, l'uso iniziale degli inibitori della PDE5 riguardava l'ipertensione e disfunzione erettile, dovuta all'effetto degli inibitori della PDE5 sulla vasodilatazione (Paternò, Faraci, & Heistad, 1996). Questo è improbabile perché uno studio precedente ha dimostrato che l'effetto dell'inibizione della PDE5 sulla memoria e sulla cognizione non è correlato agli effetti cerebrovascolari (Rutten et al., 2009). Nel nostro studio, l'applicazione in vivo di sildenafil e del composto 7a, in cui gli effetti cerebrovascolari possono essere esclusi, ha aumentato la quantità di potenziamento nelle fettine perfuse con oTau. Pertanto, le osservazioni di cui sopra, così come la progettazione del nostro studio, escludono la possibilità che gli inibitori della PDE5 possano esercitare la loro azione attraverso una maggiore vasodilatazione.

Come con gli inibitori della PDE5, il ruolo del PKG nella memoria spaziale e associativa è stato studiato nei topi iniettati oTau. Nel presente studio, dimostriamo che la somministrazione intraperitoneale dell'attivatore della PKG, il 8-pCPT-cGMP, nei topi

trattati con oTau migliora il deficit di memoria nel RAWM e nei compiti di condizionamento della paura. Pertanto, forniamo la prova che l'attivazione della PKG migliora la compromissione della memoria indotta da oTau. Questo risultato è coerente con l'osservazione che gli inibitori della PKG bloccano il potenziamento e la somministrazione esogena di PKG producendo un potenziamento dipendente dall'attività che imita quello indotto dalla stimolazione tetanica (Arancio et al., 2001). Di conseguenza, l'inibizione dell'attività della PKG post-allenamento che ha come fine quello di inibire, in effetti impedisce la formazione di memoria (Bernabeu, Schmitz, Faillace, Izquierdo, & Medina, 1996). Pertanto, forniamo la prova che l'attivazione della PKG migliora l'indebolimento della memoria indotto da oTau.

L'elevazione della fosforilazione del CREB svolge un ruolo chiave nell'induzione della plasticità sinaptica e della formazione della memoria. È noto che l'aumento di pCREB è presente sia a 1 min che a 60 min dopo la stimolazione tetanica per indurre la LTP o dopo lo shock elettrico per indurre formazione di memoria (Puzzo et al., 2005). Qui abbiamo dimostrato che l'elevazione del cGMP protegge contro il deficit nella fosforilazione del CREB durante la formazione della memoria e quindi potrebbe essere terapeuticamente rilevante. Tuttavia, esistono altre cascate con secondi messaggeri che coinvolgono CREB oltre a quella del NO, e quindi potrebbero essere sfruttate per la scoperta di nuovi farmaci (Teich et al., 2015). Inoltre, l'elevazione del cGMP, che è nota per essere transitoria e si pensa che agisca immediatamente dopo la LTP o l'induzione della memoria [35, 55, 88], potrebbe avere bersagli multipli oltre a PKG (cioè i canali ionici aperti dai nucleotidi ciclici o quelli dipendenti dalla iperpolarizzazione e aperti dai nucleotidi ciclici) (Kleppisch & Feil, 2009) che potrebbero svolgere un ruolo nel ristabilire la memoria altrimenti ridotta da oTau. Infine, la modulazione di bersagli a valle di PKG tra cui l'organizzazione citoscheletrica, il traffico delle vescicole e dei recettori AMPA, e dell'espressione genica tramite fosforilazione di vari substrati tra cui VASP, RhoA, RGS2, hSERT, GluR1, substrato G e DARPP-32, potrebbero anche essere attraenti come obiettivo terapeutico (Kleppisch & Feil, 2009).

Ad oggi, non ci sono prove cliniche che suggeriscano un effetto protettivo degli inibitori della PDE5 contro la patologia dell' AD. Una valutazione clinica dell'efficacia del sildenafil contro la perdita di memoria nei pazienti con AD richiederebbe una somministrazione cronica del composto a una popolazione anziana. Tuttavia, probabilmente a causa della mancanza di specificità dell'inibitore che potrebbe causare effetti collaterali, questo non è stato tentato. Il presente studio fa parte di un programma di sviluppo di farmaci finalizzato all'ottenimento di un inibitore di PDE5 altamente specifico e permeabile al cervello. Il composto 7a è stato ottenuto come risultato di questo sforzo nella scoperta di nuovi farmaci e la sua efficacia farmacologica è stata precedentemente testata in modelli animali indotti da A β in AD (Fiorito et al., 2013) ed è ora testata in modelli animali con disturbo della memoria indotta da oTau. Un risultato rilevante di questo studio è l'inversione del deficit di memoria spaziale e associativo dovuto alla somministrazione intracerebrale di oTau nei topi dopo il trattamento acuto con inibitori della PDE5. Entrambi i tipi di memoria sono compromessi nelle prime fasi dell' AD (Cushman, Stein, & Duffy, 2008). Inoltre, è stata condotta un'ulteriore indagine allo scopo di correlare il miglioramento dei livelli di cGMP con l'up-regulation della cascata di NO che porta ad un aumento dei livelli di pCREB. Un saggio biochimico ELISA eseguito sugli ippocampi di topi trattati con oTau ha rivelato una drastica riduzione dell'elevazione del cGMP durante la formazione della memoria, che è stata contrastata dal trattamento con il composto inibitore della PDE5, il 7a. È interessante notare che i livelli di cGMP dopo l'induzione di LTP non potevano essere misurati a causa della mancanza di un metodo quantitativo in grado di rilevare cambiamenti nei livelli di cGMP nelle pochissime fibre situate sotto l'elettrodo stimolante durante la stimolazione tetanica. Tuttavia, l'osservazione che l'inibizione della PDE5 ristabilisce i livelli normali di cGMP dopo una scarica elettrica suggerisce fortemente che l'inibizione della PDE5 è benefica contro la perdita di memoria nelle patologie di oTau.

La disregolazione della cascata del NO nell'AD è stata dimostrata in proteomica e in studi metabolomici (Hannibal, 2016). Coerentemente con questo risultato, è stato dimostrato che il pathway NO/cGMP/PKG/CREB è downregolato in modelli murini di deposizione dell'amiloide e la sua downregolazione è stata principalmente attribuita alla

presenza di oligomeri di A β (Puzzo et al., 2014). Nell'ambito del presente lavoro, abbiamo esteso queste osservazioni a forme solubili di tau. Un tale parallelismo può essere dovuto a numerose caratteristiche comuni degli oligomeri di tau e A β , compreso la struttura beta-sheet, il suo stato di aggregazione (Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza, Guerrero-Muoz, Jackson, & Kaye, 2010), il rilascio dipendente dall'attività (Yamada et al., 2014), la capacità di entrare nei neuroni (Fá et al., 2016)(J. W. Wu et al., 2013) e influenzare la segnalazione astrocitaria del calcio intracellulare (Piacentini et al., 2017) e il legame di proteine alla superficie cellulare, come ad esempio la proteina precursore dell'amiloide (APP) (Takahashi et al., 2015).

La scoperta degli aggregati solubili di tau e il loro coinvolgimento nella patogenesi dell'AD hanno innescato lo sviluppo di terapie volte a fermare l'aggregazione di tau (Crowe et al., 2013) o indurre la clearance di tau grazie alla immunoterapia (Boutajangout et al., 2010). Tuttavia, sono state espresse preoccupazioni in merito all'efficacia di questi trattamenti, in quanto potrebbero ridurre il carico complessivo di NFTs senza riduzione di oTau. Inoltre, considerando il fatto che è stato suggerito che le NFTs possano avere una funzione protettiva (Spires-Jones, Kopeikina, Koffie, de Calignon, & Hyman, 2011), prevenendo la diffusione della patologia, ulteriori approcci con tau potrebbero essere dannosi. Inoltre, tau svolge un ruolo chiave nella fisiologia cellulare; quindi le terapie che influenzano direttamente i livelli di tau potrebbero interferire con il normale ruolo fisiologico normale di tau. L'immunoterapia infine potrebbe essere controproducente perché la maggior parte degli anticorpi mostra un'alta affinità per tau, senza legarsi alle varie conformazioni specifiche di tau coinvolte nel suo "seeding" (Evidenze sperimentali emergenti suggeriscono che la diffusione della patologia tau nel cervello nelle Tauopatie riflette la propagazione di specie di tau anormali lungo aree cerebrali collegate neuroanatomicamente. Questa propagazione potrebbe avvenire attraverso un meccanismo "prionico" che implica il trasferimento di semi di tau anormali da una "cellula donatrice" a una "cellula ricevente" e il reclutamento di tau normali nel secondo per generare nuovi semi di tau.) (Todd E Golde, Lewis, & McFarland, 2013). In tal modo noi suggeriamo una strategia alternativa per proteggere dal deficit della memoria indotto da tau che sarebbe così mediata da farmaci che agiscono

a valle della produzione del NO. A questo proposito, l'eccezionale profilo di sicurezza degli inibitori della PDE5 li rende particolarmente attraenti, come mezzo valido per contrastare l'AD.

2.6 Conclusione

Le nostre scoperte forniscono una nuova visione di come oTau influenzi la plasticità sinaptica e la memoria, indicando la cascata del NO come un pathway che può essere sfruttato per contrastare il danno tau-indotto sulla plasticità sinaptica e sulla memoria, e offrendo una nuova finestra di opportunità terapeutiche contro l'AD e altre malattie neurodegenerative caratterizzate da un aumento di tau.

Bibliografia

- Abe, T., Tohgi, H., Murata, T., Isobe, C., & Sato, C. (2001). Reduction in asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 312(3), 177–179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602339>
- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R., & Bourchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, 88(5), 615–626. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054501>
- Ahn, S., Ginty, D. D., & Linden, D. J. (1999). A late phase of cerebellar long-term depression requires activation of CaMKIV and CREB. *Neuron*, 23(3), 559–568. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433267>
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., ... Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 383–421. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858586>
- Alamed, J., Wilcock, D. M., Diamond, D. M., Gordon, M. N., & Morgan, D. (2006). Two-day radial-arm water maze learning and memory task; robust resolution of amyloid-related memory deficits in transgenic mice. *Nature Protocols*, 1(4), 1671–1679. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.275>
- Alberini, C. M., Ghirardi, M., Metz, R., & Kandel, E. R. (1994). C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia. *Cell*, 76(6), 1099–1114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137425>
- Allinquant, B., Moya, K. L., Bouillot, C., & Prochiantz, A. (1994). Amyloid precursor protein in cortical neurons: coexistence of two pools differentially distributed in axons and dendrites and association with cytoskeleton. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(11 Pt 2), 6842–6854. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965082>
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6923–6928. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>
- Alzheimer, A., Förstl, H., & Levy, R. (1991). On certain peculiar diseases of old age. *History of Psychiatry*, 2(5 Pt 1), 71–101. <https://doi.org/10.1177/0957154X9100200505>
- Amini, E., Nassireslami, E., Payandemehr, B., Khodaghali, F., Foolad, F., Khalaj, S., ... Sharifzadeh, M. (2015). Paradoxical role of PKA inhibitor on amyloid β -induced memory deficit. *Physiology & Behavior*, 149, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.029>
- Apple, D. M., Solano-Fonseca, R., & Kokovay, E. (2017). Neurogenesis in the aging brain. *Biochemical Pharmacology*, 141, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.116>
- Araki, T., Kato, H., Fujiwara, T., & Itoyama, Y. (1995). Age-related changes in bindings of second messengers in the rat brain. *Brain Research*, 704(2), 227–232. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788918>
- Arancio, O., Antonova, I., Gambaryan, S., Lohmann, S. M., Wood, J. S., Lawrence, D. S., & Hawkins, R. D. (2001). Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(1), 143–149. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150330>
- Arancio, O., Kiebler, M., Lee, C. J., Lev-Ram, V., Tsien, R. Y., Kandel, E. R., & Hawkins, R. D. (1996). Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*, 87(6), 1025–1035. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978607>
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0536-x>
- Arnáiz, E., & Almkvist, O. (2003). Neuropsychological features of mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 179, 34–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603249>
- Asuni, A. A., Boutajangout, A., Quartermain, D., & Sigurdsson, E. M. (2007). Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(34), 9115–9129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>
- Averaimo, S., & Nicol, X. (2014). Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 376. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00376>
- Back, S., Haas, P., Tschäpe, J.-A., Gruebl, T., Kirsch, J., Müller, U., ... Kins, S. (2007). beta-amyloid precursor protein can be transported independent of any sorting signal to the axonal and dendritic compartment. *Journal of Neuroscience Research*, 85(12), 2580–2590. <https://doi.org/10.1002/jnr.21239>
- Bäckman, L., Jones, S., Berger, A.-K., Laukka, E. J., & Small, B. J. (2004). Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease. *Journal of Internal Medicine*, 256(3), 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01386.x>
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell*, 110(1), 55–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150997>
- Bailey, C. H., & Chen, M. (1983). Morphological basis of long-term habituation and sensitization in Aplysia. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4592), 91–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6828885>
- Baltrons, M. A., Pedraza, C. E., Heneka, M. T., & García, A. (2002). Beta-amyloid peptides decrease soluble guanylyl cyclase expression in astroglial cells. *Neurobiology of Disease*, 10(2), 139–149. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127152>
- Baratti, C. M., & Boccia, M. M. (1999). Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behavioural Pharmacology*, 10(8), 731–737. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10780288>
- Barco, A., Alarcon, J. M., & Kandel, E. R. (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell*, 108(5), 689–703. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893339>
- Barth, A. L., McKenna, M., Glazewski, S., Hill, P., Impey, S., Storm, D., & Fox, K. (2000). Upregulation of cAMP response element-mediated gene expression during experience-dependent plasticity in adult neocortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 4206–4216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818156>
- Bartolotti, N., Bennett, D. A., & Lazarov, O. (2016). Reduced pCREB in Alzheimer's disease prefrontal cortex is reflected in peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Psychiatry*, 21(9), 1158–1166. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.111>
- Bartsch, D., Casadio, A., Karl, K. A., Serodio, P., & Kandel, E. R. (1998). CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell*, 95(2), 211–223. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790528>
- Bartsch, D., Ghirardi, M., Skehel, P. A., Karl, K. A., Herder, S. P., Chen, M., ... Kandel, E. R. (1995). Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell*, 83(6), 979–992. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521521>

- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4558), 408–414. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7046051>
- Bate, C., & Williams, A. (2015). cAMP-Inhibits Cytoplasmic Phospholipase A₂ and Protects Neurons against Amyloid-β-Induced Synapse Damage. *Biology*, 4(3), 591–606. <https://doi.org/10.3390/biology4030591>
- Baumkötter, F., Wagner, K., Eggert, S., Wild, K., & Kins, S. (2012). Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Experimental Brain Research*, 217(3–4), 389–395. <https://doi.org/10.1007/s00221-011-2878-6>
- Beher, D., Hesse, L., Masters, C. L., & Multhaup, G. (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1613–1620. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576160>
- Berg, A., & Zimmerman, I. D. (n.d.). Effects of electrical stimulation and norepinephrine on cyclic-AMP levels in the cerebral cortex of the aging rat. *Mechanisms of Ageing and Development*, 4(5–6), 377–383. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/180360>
- Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., ... Janus, C. (2007). Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(14), 3650–3662. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0587-07.2007>
- Bernabeu, R., Schmitz, P., Faillace, M. P., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7(2), 585–588. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8730835>
- Bhaskar, K., Konerth, M., Kokiko-Cochran, O. N., Cardona, A., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2010). Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron*, 68(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.023>
- Bi, M., Ittner, A., Ke, Y. D., Götz, J., & Ittner, L. M. (2011). Tau-targeted immunization impedes progression of neurofibrillary histopathology in aged P301L tau transgenic mice. *PLoS One*, 6(12), e26860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026860>
- Bignante, E. A., Heredia, F., Morfini, G., & Lorenzo, A. (2013). Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β--induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(11), 2525–2537. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.021>
- Birkenfeld, A., & Ben-Zvi, A. (1984). Age associated changes in intracellular cyclic adenosine monophosphate. *Clinical and Experimental Immunology*, 55(3), 651–654. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6323074>
- Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. (1996). CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, 87(7), 1203–1214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980227>
- Blum-Degen, D., Heinemann, T., Lan, J., Pedersen, V., Leblhuber, F., Paulus, W., ... Gerlach, M. (1999). Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. *Brain Research*, 834(1–2), 128–135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407101>
- Böhme, G. A., Bon, C., Stutzmann, J. M., Doble, A., & Blanchard, J. C. (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *European Journal of Pharmacology*, 199(3), 379–381. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1915585>
- Boimel, M., Grigoriadis, N., Lourbopoulos, A., Haber, E., Abramsky, O., & Rosenmann, H. (2010). Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Experimental Neurology*, 224(2), 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.05.010>
- Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzog, M. C., Radde, R., Staufenbiel, M., ... Jucker, M. (2007). Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *The American Journal of Pathology*, 171(6), 2012–2020. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070403>
- Bon, C. L. M., & Garthwaite, J. (2003). On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(5), 1941–1948. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629199>
- Bonkale, W. L., Cowburn, R. F., Ohm, T. G., Bogdanovic, N., & Fastbom, J. (1999). A quantitative autoradiographic study of [3H]cAMP binding to cytosolic and particulate protein kinase A in post-mortem brain staged for Alzheimer's disease neurofibrillary changes and amyloid deposits. *Brain Research*, 818(2), 383–396. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082824>
- Bonkale, W. L., Fastbom, J., Wiehager, B., Ravid, R., Winblad, B., & Cowburn, R. F. (1996). Impaired G-protein-stimulated adenylyl cyclase activity in Alzheimer's disease brain is not accompanied by reduced cyclic-AMP-dependent protein kinase A activity. *Brain Research*, 737(1–2), 155–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8930361>
- Bonkale, W. L., Winblad, B., Ravid, R., & Cowburn, R. F. (1995). Reduced nitric oxide responsive soluble guanylyl cyclase activity in the superior temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 187(1), 5–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617301>
- Bonni, A., Ginty, D. D., Dudek, H., & Greenberg, M. E. (1995). Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 6(2), 168–183. <https://doi.org/10.1006/mcne.1995.1015>
- Bordji, K., Becerril-Ortega, J., Nicole, O., & Buisson, A. (2010). Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-β production. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(47), 15927–15942. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3021-10.2010>
- Boulton, C. L., Southam, E., & Garthwaite, J. (1995). Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, 69(3), 699–703. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596640>
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., & Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1), 59–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923378>
- Boutajangout, A., Ingadottir, J., Davies, P., & Sigurdsson, E. M. (2011). Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. *Journal of Neurochemistry*, 118(4), 658–667. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07337.x>
- Boutajangout, A., Quartermain, D., & Sigurdsson, E. M. (2010). Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tau mouse model. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(49), 16559–16566. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010>
- Boxer, A. L., Lang, A. E., Grossman, M., Knopman, D. S., Miller, B. L., Schneider, L. S., ... AL-108-231 Investigators. (2014). Davunetide in patients with progressive supranuclear palsy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2/3 trial. *The Lancet. Neurology*, 13(7), 676–685. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70088-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70088-2)
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239–259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>
- Brouillet, E., Trembleau, A., Galanaud, D., Volovitch, M., Bouillot, C., Valenza, C., ... Allinquant, B. (1999). The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(5), 1717–1727. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024358>
- Bruce, D. (2001). Fifty years since Lashley's In search of the Engram: refutations and conjectures. *Journal of the Neurosciences*, *10*(3), 308–318. <https://doi.org/10.1076/jhin.10.3.308.9086>
- Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2008). Evidence that non-fibrillar tau causes pathology linked to neurodegeneration and behavioral impairments. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *14*(4), 393–399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688089>
- Brunden, K. R., Zhang, B., Carroll, J., Yao, Y., Potuzak, J. S., Hogan, A.-M. L., ... Trojanowski, J. Q. (2010). Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(41), 13861–13866. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3059-10.2010>
- Brunholz, S., Sisodia, S., Lorenzo, A., Deyts, C., Kins, S., & Morfini, G. (2012). Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells. *Experimental Brain Research*, *217*(3–4), 353–364. <https://doi.org/10.1007/s00221-011-2870-1>
- Buoso, E., Lanni, C., Schettini, G., Govoni, S., & Racchi, M. (2010). beta-Amyloid precursor protein metabolism: focus on the functions and degradation of its intracellular domain. *Pharmacological Research*, *62*(4), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.05.002>
- Burnouf, S., Gorsky, M. K., Dols, J., Grönke, S., & Partridge, L. (2015). Aβ43 is neurotoxic and primes aggregation of Aβ40 in vivo. *Acta Neuropathologica*, *130*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1419-y>
- Butt, E., Nolte, C., Schulz, S., Beltman, J., Beavo, J. A., Jastorff, B., & Walter, U. (1992). Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochemical Pharmacology*, *43*(12), 2591–2600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321624>
- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., & Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development (Cambridge, England)*, *131*(9), 2173–2181. <https://doi.org/10.1242/dev.01103>
- Cameron, R. T., Whiteley, E., Day, J. P., Parachikova, A. I., & Baillie, G. S. (2017). Selective inhibition of phosphodiesterases 4, 5 and 9 induces HSP20 phosphorylation and attenuates amyloid beta 1-42-mediated cytotoxicity. *FEBS Open Bio*, *7*(1), 64–73. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12156>
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *76*(1), 36–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719213>
- Cao, X., & Südhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5527), 115–120. <https://doi.org/10.1126/science.1058783>
- Carlesimo, G. A., & Oscar-Berman, M. (1992). Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. *Neuropsychology Review*, *3*(2), 119–169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1300219>
- Carmona, S., Hardy, J., & Guerreiro, R. (2018). The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handbook of Clinical Neurology*, *148*, 395–408. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0>
- Carrasquillo, M. M., Belbin, O., Hunter, T. A., Ma, L., Bisceglia, G. D., Zou, F., ... Younkin, S. G. (2010). Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *67*(8), 961–964. <https://doi.org/10.1001/archneuro.2010.147>
- Casadio, A., Martin, K. C., Giustetto, M., Zhu, H., Chen, M., Bartsch, D., ... Kandel, E. R. (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*, *99*(2), 221–237. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535740>
- Cashman, R. E., & Grammas, P. (1995). cAMP-dependent protein kinase in cerebral microvessels in aging and Alzheimer disease. *Molecular and Chemical Neuropathology*, *26*(3), 247–258. <https://doi.org/10.1007/BF02815141>
- Celsi, F., Svedberg, M., Unger, C., Cotman, C. W., Carri, M. T., Ottersen, O. P., ... Torp, R. (2007). Beta-amyloid causes downregulation of calcineurin in neurons through induction of oxidative stress. *Neurobiology of Disease*, *26*(2), 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.022>
- Chai, X., Wu, S., Murray, T. K., Kinley, R., Cella, C. V., Sims, H., ... Citron, M. (2011). Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology and delay of disease progression. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(39), 34457–34467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229633>
- Chakroborty, S., Kim, J., Schneider, C., Jacobson, C., Molgó, J., & Stutzmann, G. E. (2012). Early presynaptic and postsynaptic calcium signaling abnormalities mask underlying synaptic depression in presymptomatic Alzheimer's disease mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(24), 8341–8353. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0936-12.2012>
- Chakroborty, S., Kim, J., Schneider, C., West, A. R., & Stutzmann, G. E. (2015). Nitric oxide signaling is recruited as a compensatory mechanism for sustaining synaptic plasticity in Alzheimer's disease mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *35*(17), 6893–6902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4002-14.2015>
- Chalimoniuk, M., & Strosznajder, J. B. (n.d.). Aging modulates nitric oxide synthesis and cGMP levels in hippocampus and cerebellum. Effects of amyloid beta peptide. *Molecular and Chemical Neuropathology*, *35*(1–3), 77–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10343972>
- Charreau, B., Tesson, L., Soullou, J. P., Pourcel, C., & Anegon, I. (1996). Transgenesis in rats: technical aspects and models. *Transgenic Research*, *5*(4), 223–234. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755162>
- Chen, J., Martínez, J., Milner, T. A., Buck, J., & Levin, L. R. (2013). Neuronal expression of soluble adenylyl cyclase in the mammalian brain. *Brain Research*, *1518*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.027>
- Chen, Y., Huang, X., Zhang, Y., Rockenstein, E., Bu, G., Golde, T. E., ... Xu, H. (2012). Alzheimer's β-secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β-amyloid. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(33), 11390–11395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0757-12.2012>
- Chesler, E. J., Lu, L., Shou, S., Qu, Y., Gu, J., Wang, J., ... Williams, R. W. (2005). Complex trait analysis of gene expression uncovers polygenic and pleiotropic networks that modulate nervous system function. *Nature Genetics*, *37*(3), 233–242. <https://doi.org/10.1038/ng1518>
- Chételat, G., Landeau, B., Eustache, F., Mézence, F., Viader, F., de la Sayette, V., ... Baron, J.-C. (2005). Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study. *NeuroImage*, *27*(4), 934–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.05.015>
- Clavaguera, F., Hench, J., Lavenir, I., Schweighauser, G., Frank, S., Goedert, M., & Tolnay, M. (2014). Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathologica*, *127*(2), 299–301. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1231-5>
- Cohen, R. M., Rezaei-Zadeh, K., Weitz, T. M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., ... Town, T. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric Aβ, and frank neuronal loss. *The Journal of Neuroscience : The Official*

- Journal of the Society for Neuroscience*, 33(15), 6245–6256. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3672-12.2013>
- Cohen, T. J., Friedmann, D., Hwang, A. W., Marmorstein, R., & Lee, V. M. Y. (2013). The microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(6), 756–762. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2555>
- Colton, C. A., Vitek, M. P., Wink, D. A., Xu, Q., Cantillana, V., Previti, M. L., ... Dawson, H. (2006). NO synthase 2 (NOS2) deletion promotes multiple pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), 12867–12872. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601075103>
- Combs, C. K., Karlo, J. C., Kao, S. C., & Landreth, G. E. (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), 1179–1188. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160388>
- Corbin, J. D., & Francis, S. H. (n.d.). Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *International Journal of Clinical Practice*, 56(6), 453–459. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12166544>
- Coronel, R., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C., Muñiz-Moreno, M., Zambrano, A., Cano, E., & Liste, I. (2018). Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Molecular Neurobiology*, 55(9), 7107–7117. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0914-2>
- Cowburn, R. F., O'Neill, C., Ravid, R., Winblad, B., & Fowler, C. J. (1992). Preservation of Gi-protein inhibited adenylyl cyclase activity in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 141(1), 16–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1508395>
- Crowe, A., James, M. J., Lee, V. M.-Y., Smith, A. B., Trojanowski, J. Q., Ballatore, C., & Brunden, K. R. (2013). Aminothienopyridazines and methylene blue affect Tau fibrillization via cysteine oxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11024–11037. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436006>
- Cushman, L. A., Stein, K., & Duffy, C. J. (2008). Detecting navigational deficits in cognitive aging and Alzheimer disease using virtual reality. *Neurology*, 71(12), 888–895. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000326262.67613.fe>
- Dagnas, M., Guillou, J.-L., Prévôt, T., & Mons, N. (2013). HDAC inhibition facilitates the switch between memory systems in young but not aged mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(5), 1954–1963. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3453-12.2013>
- Dash, P. K., Hochner, B., & Kandel, E. R. (1990). Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature*, 345(6277), 718–721. <https://doi.org/10.1038/345718a0>
- Davies, P., & Maloney, A. J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 2(8000), 1403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/63862>
- Davis, G. W., Schuster, C. M., & Goodman, C. S. (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron*, 17(4), 669–679. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893024>
- Dawkins, E., & Small, D. H. (2014). Insights into the physiological function of the beta-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 129(5), 756–769. <https://doi.org/10.1111/jnc.12675>
- Dawson, G. R., Seabrook, G. R., Zheng, H., Smith, D. W., Graham, S., O'Dowd, G., ... Sirinathsinghji, D. J. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 90(1), 1–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10188929>
- DeFelipe, J. (2006). Brain plasticity and mental processes: Cajal again. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(10), 811–817. <https://doi.org/10.1038/nrn2005>
- Deisseroth, K., Bito, H., & Tsien, R. W. (1996). Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 16(1), 89–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562094>
- Devan, B. D., Pistell, P. J., Duffy, K. B., Kelley-Bell, B., Spangler, E. L., & Ingram, D. K. (2014). Phosphodiesterase inhibition facilitates cognitive restoration in rodent models of age-related memory decline. *NeuroRehabilitation*, 34(1), 101–111. <https://doi.org/10.3233/NRE-131022>
- Devi, L., Prabhu, B. M., Galati, D. F., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(35), 9057–9068. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006>
- DeVos, S. L., Goncharoff, D. K., Chen, G., Kebodeaux, C. S., Yamada, K., Stewart, F. R., ... Miller, T. M. (2013). Antisense reduction of tau in adult mice protects against seizures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(31), 12887–12897. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2107-13.2013>
- Dewachter, I., Filipkowski, R. K., Priller, C., Ris, L., Neyton, J., Croes, S., ... Van Leuven, F. (2009). Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP[V717I] transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 30(2), 241–256. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.011>
- Deyts, C., Vetrivel, K. S., Das, S., Shepherd, Y. M., Dupré, D. J., Thinakaran, G., & Parent, A. T. (2012). Novel GαS-protein signaling associated with membrane-tethered amyloid precursor protein intracellular domain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(5), 1714–1729. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5433-11.2012>
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5866), 1086–1089. <https://doi.org/10.1126/science.1152993>
- Dodart, J.-C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., ... Paul, S. M. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience*, 5(5), 452–457. <https://doi.org/10.1038/nn842>
- Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M., & Greenberg, M. E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5541), 333–339. <https://doi.org/10.1126/science.1063395>
- Domek-Łopacińska, K., & Strosznajder, J. B. (2008). The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Research*, 1216, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.108>
- Dragunow, M. (1996). A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behavior Genetics*, 26(3), 293–299. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8754252>
- Du, H., Guo, L., Wu, X., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., Chen, J. X., & Yan, S. S. (2014). Cyclophilin D deficiency rescues Aβ-impaired PKA/CREB signaling and alleviates synaptic degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(12 Pt A), 2517–2527. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.004>
- Dubnau, J., Chiang, A.-S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., ... Tully, T. (2003). The staufen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory. *Current Biology: CB*, 13(4), 286–296. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12593794>

- Duszczyk, M., Kuszczak, M., Guridi, M., Lazarewicz, J. W., & Sadowski, M. J. (2012). In vivo hippocampal microdialysis reveals impairment of NMDA receptor-cGMP signaling in APP(SW) and APP(SW)/PS1(L166P) Alzheimer's transgenic mice. *Neurochemistry International*, 61(7), 976–980. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.07.017>
- Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Alhonen, L., Janne, J., Grant, S. M., Wandosell, F., ... Cuello, A. C. (2004). Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 6(3), 209–219. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201476>
- Eftekharzadeh, B., Ramin, M., Khodagholi, F., Moradi, S., Tabrizian, K., Sharif, R., ... Sharifzadeh, M. (2012). Inhibition of PKA attenuates memory deficits induced by β -amyloid (1-42), and decreases oxidative stress and NF- κ B transcription factors. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.015>
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*, 160(1), 113–123. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207113>
- Eisele, Y. S., Obermüller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S. A., Wolburg, H., ... Jucker, M. (2010). Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6006), 980–982. <https://doi.org/10.1126/science.1194516>
- Engert, F., & Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 399(6731), 66–70. <https://doi.org/10.1038/19978>
- España, J., Valero, J., Miñano-Molina, A. J., Masgrau, R., Martín, E., Guardia-Laguarta, C., ... Saura, C. A. (2010). beta-Amyloid disrupts activity-dependent gene transcription required for memory through the CREB coactivator CRCTC1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(28), 9402–9410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2154-10.2010>
- Fá, M., Puzzo, D., Piacentini, R., Staniszewski, A., Zhang, H., Baltrons, M. A., ... Arancio, O. (2016). Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory. *Scientific Reports*, 6, 19393. <https://doi.org/10.1038/srep19393>
- Ferrer, I., Marín, C., Rey, M. J., Ribalta, T., Goutan, E., Blanco, R., ... Martí, E. (1999). BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(7), 729–739. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411343>
- Ferretti, M. T., Partridge, V., Leon, W. C., Canneva, F., Allard, S., Arvanitis, D. N., ... Cuello, A. C. (2011). Transgenic mice as a model of pre-clinical Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 8(1), 4–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143159>
- Feulner, T. M., Laws, S. M., Friedrich, P., Wagenpfeil, S., Wurst, S. H. R., Riehle, C., ... Riemenschneider, M. (2010). Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Molecular Psychiatry*, 15(7), 756–766. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.141>
- Filipcik, P., Zilka, N., Bugos, O., Kucerak, J., Koson, P., Novak, P., & Novak, M. (2012). First transgenic rat model developing progressive cortical neurofibrillary tangles. *Neurobiology of Aging*, 33(7), 1448–1456. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.10.015>
- Fiorito, J., Saeed, F., Zhang, H., Staniszewski, A., Feng, Y., Francis, Y. I., ... Arancio, O. (2013). Synthesis of quinoline derivatives: discovery of a potent and selective phosphodiesterase 5 inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.009>
- Flach, K., Hilbrich, I., Schiffmann, A., Gärtner, U., Krüger, M., Leonhardt, M., ... Holzer, M. (2012). Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43223–43233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.396176>
- Foulkes, N. S., Borrelli, E., & Sassone-Corsi, P. (1991). CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell*, 64(4), 739–749. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1847666>
- Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D., & Sibley, D. (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 525–563. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002907>
- Francis, Y. I., Fà, M., Ashraf, H., Zhang, H., Staniszewski, A., Latchman, D. S., & Arancio, O. (2009). Dysregulation of histone acetylation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 18(1), 131–139. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1134>
- Frey, U., & Morris, R. G. (n.d.). Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology*, 37(4–5), 545–552. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704995>
- Frey, U., & Morris, R. G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385(6616), 533–536. <https://doi.org/10.1038/385533a0>
- Fulop, T., Kekessy, D., & Foris, G. (1990). Altered post-receptorial signal transduction mechanism under various stimulation in polymorphonuclear granulocytes of Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 52(2–3), 277–285. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157926>
- Funk, K. E., Thomas, S. N., Schafer, K. N., Cooper, G. L., Liao, Z., Clark, D. J., ... Kuret, J. (2014). Lysine methylation is an endogenous post-translational modification of tau protein in human brain and a modulator of aggregation propensity. *The Biochemical Journal*, 462(1), 77–88. <https://doi.org/10.1042/BJ20140372>
- Gao, Y.-L., Wang, N., Sun, F.-R., Cao, X.-P., Zhang, W., & Yu, J.-T. (2018). Tau in neurodegenerative disease. *Annals of Translational Medicine*, 6(10), 175. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.04.23>
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K., & Mayer, B. (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Molecular Pharmacology*, 48(2), 184–188. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544433>
- Garzon, D. J., & Fahnstock, M. (2007). Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(10), 2628–2635. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5053-06.2007>
- Geiger, J., Nolte, C., Butt, E., Sage, S. O., & Walter, U. (1992). Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(3), 1031–1035. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310537>
- Gheyara, A. L., Ponnusamy, R., Djukic, B., Craft, R. J., Ho, K., Guo, W., ... Mucke, L. (2014). Tau reduction prevents disease in a mouse model of Dravet syndrome. *Annals of Neurology*, 76(3), 443–456. <https://doi.org/10.1002/ana.24230>
- Giacobini, E. (2000). Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer disease. *Neurochemical Research*, 25(9–10), 1185–1190. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059792>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., & Crowther, R. A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO Journal*, 8(2), 393–399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2498079>
- Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., & Younkin, S. G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5045), 728–730. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1738847>

- Golde, T. E., Lewis, J., & McFarland, N. R. (2013). Anti-tau antibodies: hitting the target. *Neuron*, *80*(2), 254–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.009>
- Gong, B., Vitolo, O. V., Trinchese, F., Liu, S., Shelanski, M., & Arancio, O. (2004). Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *The Journal of Clinical Investigation*, *114*(11), 1624–1634. <https://doi.org/10.1172/JCI22831>
- Gonzalez, G. A., & Montminy, M. R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, *59*(4), 675–680. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2573431>
- Gorczyca, W. A., Kobiak, M., Kuropatwa, M., & Kurowska, E. (2003). Ca²⁺ differently affects hydrophobic properties of guanylyl cyclase-activating proteins (GCAPs) and recoverin. *Acta Biochimica Polonica*, *50*(2), 367–376. <https://doi.org/035002367>
- Götz, J., Bodea, L.-G., & Goedert, M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *19*(10), 583–598. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0054-8>
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., & Nitsch, R. M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5534), 1491–1495. <https://doi.org/10.1126/science.1062097>
- Götz, J., Eckert, A., Matamales, M., Ittner, L. M., & Liu, X. (2011). Modes of A β toxicity in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *68*(20), 3359–3375. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0750-2>
- Götz, J., Schonrock, N., Vissel, B., & Ittner, L. M. (2009). Alzheimer's disease selective vulnerability and modeling in transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *18*(2), 243–251. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1143>
- Gralle, M., Botelho, M. G., & Wouters, F. S. (2009). Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(22), 15016–15025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808755200>
- Gralle, M., Oliveira, C. L. P., Guerreiro, L. H., McKinstry, W. J., Galatis, D., Masters, C. L., ... Ferreira, S. T. (2006). Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *Journal of Molecular Biology*, *357*(2), 493–508. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.053>
- Grammas, P., Roher, A. E., & Ball, M. J. (n.d.). Increased accumulation of cAMP in cerebral microvessels in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *15*(1), 113–116. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8159257>
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., & Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science (New York, N.Y.)*, *234*(4772), 80–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3749894>
- Grimm, M. O. W., Mett, J., Stahlmann, C. P., Hauptenthal, V. J., Zimmer, V. C., & Hartmann, T. (2013). Nephrylin and A β Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *5*, 98. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00098>
- Grundman, M., Petersen, R. C., Ferris, S. H., Thomas, R. G., Aisen, P. S., Bennett, D. A., ... Alzheimer's Disease Cooperative Study. (2004). Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Archives of Neurology*, *61*(1), 59–66. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.1.59>
- Guzowski, J. F., & McLaughlin, J. L. (1997). Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(6), 2693–2698. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9122258>
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McLaughlin, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(14), 5089–5098. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438584>
- Guzowski, J. F., Timlin, J. A., Roysam, B., McNaughton, B. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(5), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.018>
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(5), a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
- Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y., & Selkoe, D. J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, *357*(6378), 500–503. <https://doi.org/10.1038/357500a0>
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., ... Teplow, D. B. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, *359*(6393), 322–325. <https://doi.org/10.1038/359322a0>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Handley, R. R., Reid, S. J., Patassini, S., Rudiger, S. R., Obolonkin, V., McLaughlan, C. J., ... Snell, R. G. (2016). Metabolic disruption identified in the Huntington's disease transgenic sheep model. *Scientific Reports*, *6*, 20681. <https://doi.org/10.1038/srep20681>
- Hannibal, L. (2016). Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Current Alzheimer Research*, *13*(2), 135–149. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26391043>
- Hansen, R. A., Gartlehner, G., Lohr, K. N., & Kaufner, D. I. (2007). Functional outcomes of drug treatment in Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Drugs & Aging*, *24*(2), 155–167. <https://doi.org/10.2165/00002512-200724020-00007>
- Hara, H., Onodera, H., Kato, H., & Kogure, K. (1992). Effects of aging on signal transmission and transduction systems in the gerbil brain: morphological and autoradiographic study. *Neuroscience*, *46*(2), 475–488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347408>
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(10), 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hauser, P. S., & Ryan, R. O. (2013). Impact of apolipoprotein E on Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *10*(8), 809–817. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23919769>
- Hawk, J. D., & Abel, T. (2011). The role of NR4A transcription factors in memory formation. *Brain Research Bulletin*, *85*(1–2), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.02.001>
- He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., ... Lee, V. M.-Y. (2018). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nature Medicine*, *24*(1), 29–38. <https://doi.org/10.1038/nm.4443>
- Heckman, P. R. A., Blokland, A., Ramaekers, J., & Prickaerts, J. (2015). PDE and cognitive processing: beyond the memory domain. *Neurobiology of Learning and Memory*, *119*, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.011>
- Heroux, N. A., Osborne, B. F., Miller, L. A., Kawan, M., Buban, K. N., Rosen, J. B., & Stanton, M. E. (2018). Differential expression of the immediate early genes c-Fos, Arc, Egr-1, and Npas4 during long-term memory formation in the context preexposure facilitation effect (CPFE). *Neurobiology of Learning and Memory*, *147*, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.11.016>
- Hesse, R., Lausser, L., Gummert, P., Schmid, F., Wahler, A., Schnack, C., ... von Arnim, C. A. F. (2017). Reduced cGMP levels in CSF of AD

- patients correlate with severity of dementia and current depression. *Alzheimer's Research & Therapy*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0245-y>
- Ho, A., & Südhof, T. C. (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2548–2553. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14983046>
- Hoe, H.-S., Lee, K. J., Carney, R. S. E., Lee, J., Markova, A., Lee, J.-Y., ... Rebeck, G. W. (2009). Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(23), 7459–7473. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009>
- Hoe, H.-S., Pocivavsek, A., Dai, H., Chakraborty, G., Harris, D. C., & Rebeck, G. W. (2006). Effects of apoE on neuronal signaling and APP processing in rodent brain. *Brain Research*, 1112(1), 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.035>
- Höglinger, G. U., Huppertz, H.-J., Wagenpfeil, S., Andrés, M. V., Belloch, V., León, T., ... TAUROS MRI Investigators. (2014). Tideglusib reduces progression of brain atrophy in progressive supranuclear palsy in a randomized trial. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 29(4), 479–487. <https://doi.org/10.1002/mds.25815>
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Science Translational Medicine*, 3(77), 77sr1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>
- Hong, X.-P., Peng, C.-X., Wei, W., Tian, Q., Liu, Y.-H., Yao, X.-Q., ... Wang, J.-Z. (2010). Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 20(12), 1339–1349. <https://doi.org/10.1002/hipo.20712>
- Hu, R., Yuan, B., Wei, X., Zhao, L., Tang, J., & Chen, D. (2007). Enhanced cAMP/PKA pathway by seabuckthorn fatty acids in aged rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.016>
- Hu, Y.-S., Long, N., Pigino, G., Brady, S. T., & Lazarov, O. (2013). Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3 β , neurotrophin-3 and CREB signaling. *PLoS One*, 8(5), e64460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064460>
- Huang, Y. Y., Li, X. C., & Kandel, E. R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell*, 79(1), 69–79. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923379>
- Ibarra, C., Nedvetsky, P. I., Gerlach, M., Riederer, P., & Schmidt, H. H. (2001). Regional and age-dependent expression of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in the human brain. *Brain Research*, 907(1–2), 54–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430885>
- Impey, S., Mark, M., Villacres, E. C., Poser, S., Chavkin, C., & Storm, D. R. (1996). Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*, 16(5), 973–982. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630255>
- Impey, S., Obrietan, K., Wong, S. T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., ... Storm, D. R. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron*, 21(4), 869–883. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808472>
- Ishida, A., Furukawa, K., Keller, J. N., & Mattson, M. P. (1997). Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport*, 8(9–10), 2133–2137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9243598>
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., ... Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>
- Jack, C. R., Petersen, R. C., Xu, Y. C., Waring, S. C., O'Brien, P. C., Tangalos, E. G., ... Kokmen, E. (1997). Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. *Neurology*, 49(3), 786–794. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305341>
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32(18), 4693–4697. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490014>
- Jefferson, T., Čaušević, M., auf dem Keller, U., Schilling, O., Isbert, S., Geyer, R., ... Becker-Pauly, C. (2011). Metalloprotease mepri beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(31), 27741–27750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252718>
- Jeganathan, S., von Bergen, M., Brutlach, H., Steinhoff, H.-J., & Mandelkow, E. (2006). Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry*, 45(7), 2283–2293. <https://doi.org/10.1021/bi0521543>
- Jelicic, M., Bonebakker, A. E., & Bonke, B. (1995). Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review. *International Psychogeriatrics*, 7(3), 385–392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8821346>
- Jicha, G. A., Weaver, C., Lane, E., Vianna, C., Kress, Y., Rockwood, J., & Davies, P. (1999). cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(17), 7486–7494. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460255>
- Jones, E. G. (1994). Santiago Ramón y Cajal and the Croonian Lecture, March 1894. *Trends in Neurosciences*, 17(5), 190–192. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520199>
- Josselyn, S. A., Shi, C., Carlezon, W. A., Neve, R. L., Nestler, E. J., & Davis, M. (2001). Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(7), 2404–2412. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264314>
- Jung, H. S., Park, K.-H., Cho, Y. M., Chung, S. S., Cho, H. J., Cho, S. Y., ... Park, K. S. (2006). Resistin is secreted from macrophages in atherosclerosis and promotes atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 69(1), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.09.015>
- Kaang, B. K., Kandel, E. R., & Grant, S. G. (1993). Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in Aplysia sensory neurons. *Neuron*, 10(3), 427–435. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384857>
- Kaden, D., Munter, L.-M., Joshi, M., Treiber, C., Weise, C., Bethge, T., ... Multhaup, G. (2008). Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 7271–7279. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708046200>
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H., & Goldstein, L. S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron*, 28(2), 449–459. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11144355>
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544), 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., ... Müller-Hill, B. (n.d.). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733–736. <https://doi.org/10.1038/325733a0>
- Kaplan, A., Kent, C. B., Charron, F., & Fournier, A. E. (2014). Switching responses: spatial and temporal regulators of axon guidance. *Molecular Neurobiology*, 49(2), 1077–1086. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8582-8>

- Kawamoto, E. M., Munhoz, C. D., Glezer, I., Bahia, V. S., Caramelli, P., Nitrini, R., ... Marcourakis, T. (2005). Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 26(6), 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.011>
- Keller, L., Welander, H., Chiang, H.-H., Tjernberg, L. O., Nennesmo, I., Wallin, A. K., & Graff, C. (2010). The PSEN1 I143T mutation in a Swedish family with Alzheimer's disease: clinical report and quantification of A β in different brain regions. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 18(11), 1202–1208. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.107>
- Kfoury, N., Holmes, B. B., Jiang, H., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. (2012). Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19440–19451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346072>
- Khan, U. A., Liu, L., Provenzano, F. A., Berman, D. E., Profaci, C. P., Sloan, R., ... Small, S. A. (2014). Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 17(2), 304–311. <https://doi.org/10.1038/nn.3606>
- Kibbey, M. C., Jucker, M., Weeks, B. S., Neve, R. L., Van Nostrand, W. E., & Kleinman, H. K. (1993). beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), 10150–10153. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8234269>
- Kida, S., Josselyn, S. A., Peña de Ortiz, S., Kogan, J. H., Chevere, I., Masushige, S., & Silva, A. J. (2002). CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nature Neuroscience*, 5(4), 348–355. <https://doi.org/10.1038/nn819>
- Kim, S. H., Nairn, A. C., Cairns, N., & Lubec, G. (2001). Decreased levels of ARPP-19 and PKA in brains of Down syndrome and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, (61), 263–272. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11771749>
- Klein, A., Sacrey, L.-A. R., Whishaw, I. Q., & Dunnett, S. B. (2012). The use of rodent skilled reaching as a translational model for investigating brain damage and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(3), 1030–1042. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.010>
- Kleppisch, T., & Feil, R. (2009). cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (191), 549–579. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_24
- Koglin, M., Stasch, J.-P., & Behrends, S. (2002). BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(4), 1057–1062. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6764>
- Kojro, E., & Fahrenholz, F. (2005). The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Sub-Cellular Biochemistry*, 38, 105–127. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709475>
- Kondo, A., Shahpasand, K., Mannix, R., Qiu, J., Moncaster, J., Chen, C.-H., ... Lu, K. P. (2015). Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature*, 523(7561), 431–436. <https://doi.org/10.1038/nature14658>
- Koo, E. H., Sisodia, S. S., Archer, D. R., Martin, L. J., Weidemann, A., Beyreuther, K., ... Price, D. L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), 1561–1565. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689489>
- Kornhauser, J. M., Cowan, C. W., Shaywitz, A. J., Dolmetsch, R. E., Griffith, E. C., Hu, L. S., ... Greenberg, M. E. (2002). CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*, 34(2), 221–233. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11970864>
- Kremer, A., Louis, J. V., Jaworski, T., & Van Leuven, F. (2011). GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction.... *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00017>
- Kumar, A., & Tsao, J. W. (2018). *Alzheimer Disease. StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763097>
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., ... Klein, W. L. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(45), 10191–10200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3432-04.2004>
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., ... Klein, W. L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(4), 796–807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007>
- Lamprecht, R., Hazvi, S., & Dudai, Y. (1997). cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(21), 8443–8450. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334416>
- Landes, A. M., Sperry, S. D., Strauss, M. E., & Geldmacher, D. S. (2001). Apathy in Alzheimer's disease. *Journal of the American Geriatrics Society*, 49(12), 1700–1707. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844006>
- Lane, R. F., Shineman, D. W., Steele, J. W., Lee, L. B. H., & Fillit, H. M. (2012). Beyond amyloid: the future of therapeutics for Alzheimer's disease. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 64, 213–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394816-8.00007-6>
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Guerrero-Muoz, M. J., Jackson, G. R., & Kaye, R. (2010). Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry*, 49(47), 10039–10041. <https://doi.org/10.1021/bi1016233>
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., ... Kaye, R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Scientific Reports*, 2, 700. <https://doi.org/10.1038/srep00700>
- Law, A., O'Donnell, J., Gauthier, S., & Quirion, R. (2002). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience*, 112(2), 267–275. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044445>
- Lee, Y.-S., & Silva, A. J. (2009). The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(2), 126–140. <https://doi.org/10.1038/nrn2572>
- Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D. I., Spoerri, L., Ciccotosto, G. D., Wright, D. K., ... Bush, A. I. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nature Medicine*, 18(2), 291–295. <https://doi.org/10.1038/nm.2613>
- Leon, W. C., Canneva, F., Partridge, V., Allard, S., Ferretti, M. T., DeWilde, A., ... Cuello, A. C. (2010). A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 20(1), 113–126. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1349>
- Leroy, K., Ando, K., Laporte, V., Dedecker, R., Suain, V., Authélet, M., ... Brion, J.-P. (2012). Lack of tau proteins rescues neuronal cell death and decreases amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 mice. *The American Journal of Pathology*, 181(6), 1928–1940. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.012>
- Li, D.-B., Tang, J., Fan, X.-T., Song, M., Xu, H.-W., & Bai, Y. (2006). Comparative study of histopathology changes between the PS1/APP double transgenic mouse model and Abeta1-40-injected rat model of Alzheimer disease. *Neuroscience Bulletin*, 22(1), 52–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684540>
- Li, G., Silverman, J. M., Altstiel, L. D., Haroutunian, V., Perl, D. P., Purohit, D., ... Davis, K. L. (1996). Apolipoprotein E-epsilon 4 allele and

- familial risk in Alzheimer's disease. *Genetic Epidemiology*, 13(3), 285–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2272\(1996\)13:3<285::AID-GEPI5>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2272(1996)13:3<285::AID-GEPI5>3.0.CO;2-5)
- Li, H.-L., Wang, H.-H., Liu, S.-J., Deng, Y.-Q., Zhang, Y.-J., Tian, Q., ... Wang, J.-Z. (2007). Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing beta-catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3591–3596. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609303104>
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N. E., Walsh, D. M., Shankar, G. M., & Selkoe, D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*, 62(6), 788–801. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.012>
- Lian, Q., Ladner, C. J., Magnuson, D., & Lee, J. M. (2001). Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Experimental Neurology*, 167(1), 158–165. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7534>
- Liang, Z., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C.-X. (2007). Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry*, 103(6), 2462–2470. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04942.x>
- Liu, H., Jin, X., Yin, X., Jin, N., Liu, F., & Qian, W. (2015). PKA-CREB Signaling Suppresses Tau Transcription. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 46(1), 239–248. <https://doi.org/10.3233/JAD-142610>
- Liu, P., Smith, P. F., Appleton, I., Darlington, C. L., & Bilkey, D. K. (2003). Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience*, 119(3), 679–687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809689>
- Liu, P., Smith, P. F., Appleton, I., Darlington, C. L., & Bilkey, D. K. (2004). Age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the rat prefrontal cortex. *Neurobiology of Aging*, 25(4), 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.07.003>
- Liu, P., Smith, P. F., Appleton, I., Darlington, C. L., & Bilkey, D. K. (2005). Hippocampal nitric oxide synthase and arginase and age-associated behavioral deficits. *Hippocampus*, 15(5), 642–655. <https://doi.org/10.1002/hipo.20085>
- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605–623. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194863>
- Lourenço, F. C., Galvan, V., Fombonne, J., Corset, V., Llambi, F., Müller, U., ... Mehlen, P. (2009). Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death and Differentiation*, 16(5), 655–663. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.191>
- Lovestone, S., Boada, M., Dubois, B., Hüll, M., Rinne, J. O., Huppertz, H.-J., ... ARGO investigators. (2015). A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 45(1), 75–88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>
- Lustbader, J. W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H. W., Takuma, K., Wang, N., ... Wu, H. (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5669), 448–452. <https://doi.org/10.1126/science.1091230>
- Lüth, H.-J., Münch, G., & Arendt, T. (2002). Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. *Brain Research*, 953(1–2), 135–143. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384247>
- Ma, H., Lesné, S., Kotilinek, L., Steidl-Nichols, J. V., Sherman, M., Younkin, L., ... Ashe, K. H. (2007). Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8167–8172. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609521104>
- Ma, Q.-L., Harris-White, M. E., Ubeda, O. J., Simmons, M., Beech, W., Lim, G. P., ... Cole, G. M. (2007). Evidence of Abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *Journal of Neurochemistry*, 103(4), 1594–1607. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04869.x>
- Maki, T., Okamoto, Y., Carare, R. O., Hase, Y., Hattori, Y., Hawkes, C. A., ... Ihara, M. (2014). Phosphodiesterase III inhibitor promotes drainage of cerebrovascular beta-amyloid. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(8), 519–533. <https://doi.org/10.1002/acn3.79>
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., & Reddy, P. H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 15(9), 1437–1449. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl066>
- Mandell, J. W., & Banker, G. A. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(18), 5727–5740. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8795628>
- Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S. C., Kern, H., Kretz, O., Martin Villalba, A., ... Schütz, G. (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nature Genetics*, 31(1), 47–54. <https://doi.org/10.1038/ng882>
- Marambaud, P., Wen, P. H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., & Robakis, N. K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell*, 114(5), 635–645. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678586>
- Martin, K. C., Casadio, A., Zhu, H., Yaping, E., Rose, J. C., Chen, M., ... Kandel, E. R. (1997). Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell*, 91(7), 927–938. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9428516>
- Martin, K. C., Michael, D., Rose, J. C., Barad, M., Casadio, A., Zhu, H., & Kandel, E. R. (1997). MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in Aplysia. *Neuron*, 18(6), 899–912. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9208858>
- Martínez, M., Fernández, E., Frank, A., Guaza, C., de la Fuente, M., & Hernanz, A. (1999). Increased cerebrospinal fluid cAMP levels in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 846(2), 265–267. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556645>
- Martínez, M., Hernández, A. I., & Hernanz, A. (2001). Increased cAMP immunostaining in cerebral vessels in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 922(1), 148–152. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11730714>
- Matsuda, S., Yasukawa, T., Homma, Y., Ito, Y., Niikura, T., Hiraki, T., ... Nishimoto, I. (2001). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), 6597–6607. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517249>
- Matsumoto, Y., Matsumoto, C. S., Takahashi, T., & Mizunami, M. (2016). Activation of NO-cGMP Signaling Rescues Age-Related Memory Impairment in Crickets. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 166. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00166>
- Mattson, M. P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiological Reviews*, 77(4), 1081–1132. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.4.1081>
- Mayr, B. M., Canettieri, G., & Montminy, M. R. (2001). Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10936–10941. <https://doi.org/10.1073/pnas.191152098>
- McGowan, E., Eriksen, J., & Hutton, M. (2006). A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends in Genetics : TIG*, 22(5), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.007>
- McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., ... Golde, T. (2005). Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron*, 47(2), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.030>

- McLachlan, C. S., Chen, M. L., Lynex, C. N., Goh, D. L. M., Brenner, S., & Tay, S. K. H. (2007). Changes in PDE4D isoforms in the hippocampus of a patient with advanced Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *64*(3), 456–457. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.3.456>
- McLoughlin, D. M., & Miller, C. C. J. (2008). The FE65 proteins and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *86*(4), 744–754. <https://doi.org/10.1002/jnr.21532>
- Miravalle, L., Calero, M., Takao, M., Roher, A. E., Ghetti, B., & Vidal, R. (2005). Amino-terminally truncated Abeta peptide species are the main component of cotton wool plaques. *Biochemistry*, *44*(32), 10810–10821. <https://doi.org/10.1021/bi0508237>
- Mizuno, M., Yamada, K., Maekawa, N., Saito, K., Seishima, M., & Nabeshima, T. (2002). CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behavioural Brain Research*, *133*(2), 135–141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110446>
- Möller, H. J., & Graeber, M. B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *248*(3), 111–122. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728729>
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., & Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(18), 6682–6686. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2875459>
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., & Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron*, *70*(3), 410–426. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.009>
- Mucke, L., Masliah, E., Johnson, W. B., Ruppe, M. D., Alford, M., Rockenstein, E. M., ... Abraham, C. R. (1994). Synaptotropic effects of human amyloid beta protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Research*, *666*(2), 151–167. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7882025>
- Müller, M., Cárdenas, C., Mei, L., Cheung, K.-H., & Foskett, J. K. (2011). Constitutive cAMP response element binding protein (CREB) activation by Alzheimer's disease presenilin-driven inositol trisphosphate receptor (InsP3R) Ca²⁺ signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(32), 13293–13298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109297108>
- Munter, L.-M., Voigt, P., Harmeyer, A., Kaden, D., Gottschalk, K. E., Weise, C., ... Multhaup, G. (2007). GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *The EMBO Journal*, *26*(6), 1702–1712. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601616>
- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5573), 1636–1639. <https://doi.org/10.1126/science.1071550>
- Nicol, X., & Gaspar, P. (2014). Routes to cAMP: shaping neuronal connectivity with distinct adenylate cyclases. *The European Journal of Neuroscience*, *39*(11), 1742–1751. <https://doi.org/10.1111/ejn.12543>
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., & Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*, *362*(6415), 75–79. <https://doi.org/10.1038/362075a0>
- Norstrom, E. (2017). Metabolic processing of the amyloid precursor protein -- new pieces of the Alzheimer's puzzle. *Discovery Medicine*, *23*(127), 269–276. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28595039>
- O'Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R., & Arancio, O. (1991). Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(24), 11285–11289. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684863>
- O'Neill, C., Wiehager, B., Fowler, C. J., Ravid, R., Winblad, B., & Cowburn, R. F. (1994). Regionally selective alterations in G protein subunit levels in the Alzheimer's disease brain. *Brain Research*, *636*(2), 193–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8012802>
- Ohm, T. G., Bohl, J., & Lemmer, B. (1989). Reduced cAMP-signal transduction in postmortem hippocampus of demented old people. *Progress in Clinical and Biological Research*, *317*, 501–509. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2557639>
- Ohm, T. G., Bohl, J., & Lemmer, B. (1991). Reduced basal and stimulated (isoprenaline, Gpp(NH)p, forskolin) adenylate cyclase activity in Alzheimer's disease correlated with histopathological changes. *Brain Research*, *540*(1–2), 229–236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2054615>
- Ojo, J.-O., Mouzon, B., Greenberg, M. B., Bachmeier, C., Mullan, M., & Crawford, F. (2013). Repetitive mild traumatic brain injury augments tau pathology and glial activation in aged hTau mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *72*(2), 137–151. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182814cfd>
- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., & Nishimoto, I. (1995). Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(9), 4205–4208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876177>
- Orejana, L., Barros-Miñones, L., Jordán, J., Puerta, E., & Aguirre, N. (2012). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiology of Aging*, *33*(3), 625.e11–20. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.018>
- Paakkari, I., & Lindsberg, P. (1995). Nitric oxide in the central nervous system. *Annals of Medicine*, *27*(3), 369–377. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546627>
- Palmeri, A., Privitera, L., Giunta, S., Loreto, C., & Puzzo, D. (2013). Inhibition of phosphodiesterase-5 rescues age-related impairment of synaptic plasticity and memory. *Behavioural Brain Research*, *240*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.060>
- Palop, J. J., Jones, B., Kekoni, L., Chin, J., Yu, G.-Q., Raber, J., ... Mucke, L. (2003). Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(16), 9572–9577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133381100>
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., ... Checler, F. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron*, *46*(4), 541–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.008>
- Pardy, K., Adan, R. A., Carter, D. A., Seah, V., Burbach, J. P., & Murphy, D. (1992). The identification of a cis-acting element involved in cyclic 3',5'-adenosine monophosphate regulation of bovine vasopressin gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(30), 21746–21752. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1339438>
- Paris, D., Town, T., Parker, T. A., Tan, J., Humphrey, J., Crawford, F., & Mullan, M. (1999). Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Experimental Neurology*, *157*(1), 211–221. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7055>
- Patel, N. V., Gordon, M. N., Connor, K. E., Good, R. A., Engelman, R. W., Mason, J., ... Finch, C. E. (2005). Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models. *Neurobiology of Aging*, *26*(7), 995–1000. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.014>
- Paternò, R., Faraci, F. M., & Heistad, D. D. (1996). Role of Ca(2+)-dependent K⁺ channels in cerebral vasodilatation induced by increases in cyclic GMP and cyclic AMP in the rat. *Stroke*, *27*(9), 1603–7; discussion 1607–8. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784136>
- Paul, V., Reddy, L., & Ekambaram, P. (2005). A reversal by L-arginine and sodium nitroprusside of ageing-induced memory impairment in rats by increasing nitric oxide concentration in the hippocampus. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 49(2), 179–186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170986>
- Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., & Cowburn, R. F. (1999). Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(9), 1010–1019. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499443>
- Pérez-Torres, S., Cortés, R., Tolnay, M., Probst, A., Palacios, J. M., & Mengod, G. (2003). Alterations on phosphodiesterase type 7 and 8 isozyme mRNA expression in Alzheimer's disease brains examined by in situ hybridization. *Experimental Neurology*, 182(2), 322–334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12895443>
- Perissi, V., Dasen, J. S., Kurokawa, R., Wang, Z., Korzus, E., Rose, D. W., ... Rosenfeld, M. G. (1999). Factor-specific modulation of CREB-binding protein acetyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3652–3657. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10097092>
- Pham, T. A., Rubenstein, J. L., Silva, A. J., Storm, D. R., & Stryker, M. P. (2001). The CRE/CREB pathway is transiently expressed in thalamic circuit development and contributes to refinement of retinogeniculate axons. *Neuron*, 31(3), 409–420. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516398>
- Phillips, H. S., Hains, J. M., Armanini, M., Laramée, G. R., Johnson, S. A., & Winslow, J. W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, 7(5), 695–702. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1742020>
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274–285. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590953>
- Piacentini, R., Li Puma, D. D., Mainardi, M., Lazzarino, G., Tavazzi, B., Arancio, O., & Grassi, C. (2017). Reduced gliotransmitter release from astrocytes mediates tau-induced synaptic dysfunction in cultured hippocampal neurons. *Glia*, 65(8), 1302–1316. <https://doi.org/10.1002/glia.23163>
- Piedrafita, B., Cauli, O., Montoliu, C., & Felipo, V. (2007). The function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain in vivo and learning ability decrease in parallel in mature compared with young rats. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(4), 254–258. <https://doi.org/10.1101/lm.541307>
- Pittenger, C., Huang, Y. Y., Paletzki, R. F., Bourtochouladze, R., Scanlin, H., Vronskaya, S., & Kandel, E. R. (2002). Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron*, 34(3), 447–462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988175>
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C., & Pearson, H. A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5531–5535. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843253>
- Porte, Y., Buhot, M.-C., & Mons, N. (2008). Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. *Neurobiology of Aging*, 29(10), 1533–1546. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.023>
- Prickaerts, J., de Vente, J., Honig, W., Steinbusch, H. W. M., & Blokland, A. (2002). cGMP, but not cAMP, in rat hippocampus is involved in early stages of object memory consolidation. *European Journal of Pharmacology*, 436(1–2), 83–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834250>
- Prieto, G. A., Trieu, B. H., Dang, C. T., Bilousova, T., Gylys, K. H., Berchtold, N. C., ... Cotman, C. W. (2017). Pharmacological Rescue of Long-Term Potentiation in Alzheimer Diseased Synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(5), 1197–1212. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2774-16.2016>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600700>
- Pugazhenthil, S., Wang, M., Pham, S., Sze, C.-I., & Eckman, C. B. (2011). Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in Aβ-treated rat hippocampal neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 60. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-60>
- Puri, S. K., & Volicer, L. (1981). Age-related changes of cyclic nucleotide levels in rat brain regions. *Mechanisms of Ageing and Development*, 15(3), 239–242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6265714>
- Puzzo, D., Loreto, C., Giunta, S., Musumeci, G., Frasca, G., Podda, M. V., ... Palmeri, A. (2014). Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on apoptosis and beta amyloid load in aged mice. *Neurobiology of Aging*, 35(3), 520–531. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.002>
- Puzzo, D., Piacentini, R., Fà, M., Gulisano, W., Li Puma, D. D., Staniszewski, A., ... Arancio, O. (2017). LTP and memory impairment caused by extracellular Aβ and Tau oligomers is APP-dependent. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.26991>
- Puzzo, D., Privitera, L., Fa', M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., ... Arancio, O. (2011). Endogenous amyloid-β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Annals of Neurology*, 69(5), 819–830. <https://doi.org/10.1002/ana.22313>
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(53), 14537–14545. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008>
- Puzzo, D., Staniszewski, A., Deng, S. X., Privitera, L., Leznik, E., Liu, S., ... Arancio, O. (2009). Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(25), 8075–8086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0864-09.2009>
- Puzzo, D., Vitolo, O., Trinchese, F., Jacob, J. P., Palmeri, A., & Arancio, O. (2005). Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(29), 6887–6897. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5291-04.2005>
- Qiu, W. Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E. H., & Selkoe, D. J. (1995). Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(3 Pt 2), 2157–2167. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7891158>
- Qiu, Z., & Ghosh, A. (2008). A calcium-dependent switch in a CREST-BRG1 complex regulates activity-dependent gene expression. *Neuron*, 60(5), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.040>
- Raghunandan, R., & Ingram, V. M. (1995). Hyperphosphorylation of the cytoskeletal protein Tau by the MAP-kinase PK40erk2: regulation by prior phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(3), 1056–1066. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2571>
- Ramos, B. P., Birnbaum, S. G., Lindenmayer, I., Newton, S. S., Duman, R. S., & Arnsten, A. F. T. (2003). Dysregulation of protein kinase A signaling in the aged prefrontal cortex: new strategy for treating age-related cognitive decline. *Neuron*, 40(4), 835–845. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622586>

- Reddy, P. H., Tonk, S., Kumar, S., Vijayan, M., Kandimalla, R., Kuruva, C. S., & Reddy, A. P. (2017). A critical evaluation of neuroprotective and neurodegenerative MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4), 1156–1165. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.067>
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., Möbius, H. J., & Memantine Study Group. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333–1341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013128>
- Reyes-Irisarri, E., Sánchez, A. J., García-Merino, J. A., & Mengod, G. (2007). Selective induction of cAMP phosphodiesterase PDE4B2 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(10), 923–931. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181567c31>
- Riccio, A. (2010). Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. *Nature Neuroscience*, 13(11), 1330–1337. <https://doi.org/10.1038/nn.2671>
- Riccio, A., Alvania, R. S., Lonze, B. E., Ramanan, N., Kim, T., Huang, Y., ... Ginty, D. D. (2006). A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Molecular Cell*, 21(2), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.12.006>
- Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., ... Müller, U. C. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(29), 7817–7826. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007>
- Robertson, J., Loviny, T. L., Goedert, M., Jakes, R., Murray, K. J., Anderton, B. H., & Hanger, D. P. (n.d.). Phosphorylation of tau by cyclic-AMP-dependent protein kinase. *Dementia (Basel, Switzerland)*, 4(5), 256–263. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261023>
- Russo, C., Venezia, V., Repetto, E., Nizzari, M., Violani, E., Carlo, P., & Schettini, G. (2005). The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 48(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.016>
- Rutten, K., Van Donkelaar, E. L., Ferrington, L., Blokland, A., Bollen, E., Steinbusch, H. W., ... Prickaerts, J. H. (2009). Phosphodiesterase inhibitors enhance object memory independent of cerebral blood flow and glucose utilization in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(8), 1914–1925. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.24>
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., & Greengard, P. (2003). The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5407–5415. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843239>
- Saito, T., Matsuba, Y., Yamazaki, N., Hashimoto, S., & Saido, T. C. (2016). Calpain Activation in Alzheimer's Model Mice Is an Artifact of APP and Presenilin Overexpression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(38), 9933–9936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1907-16.2016>
- Saito, Y., Akiyama, M., Araki, Y., Sumioka, A., Shiono, M., Taru, H., ... Suzuki, T. (2011). Intracellular trafficking of the amyloid β -protein precursor (APP) regulated by novel function of X11-like. *PLoS One*, 6(7), e22108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022108>
- Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J. M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., ... Schenk, D. B. (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*, 58(4), 615–622. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2475254>
- Sandebing, A., Welander, H., Winblad, B., Graff, C., & Tjernberg, L. O. (2013). The pathogenic $\text{A}\beta_{43}$ is enriched in familial and sporadic Alzheimer disease. *PLoS One*, 8(2), e55847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055847>
- Sanyal, S., Sandstrom, D. J., Hoefler, C. A., & Ramaswami, M. (2002). AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. *Nature*, 416(6883), 870–874. <https://doi.org/10.1038/416870a>
- Scavone, C., Munhoz, C. D., Kawamoto, E. M., Glezer, I., de Sá Lima, L., Marcourakis, T., & Markus, R. P. (2005). Age-related changes in cyclic GMP and PKG-stimulated cerebellar Na,K-ATPase activity. *Neurobiology of Aging*, 26(6), 907–916. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.013>
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., DeKosky, S. T., & Mufson, E. J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*, 68(18), 1501–1508. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f>
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., & Mufson, E. J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 27(10), 1372–1384. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.012>
- Scheibel, M. E., Lindsay, R. D., Tomiyasu, U., & Scheibel, A. B. (1975). Progressive dendritic changes in aging human cortex. *Experimental Neurology*, 47(3), 392–403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/48474>
- Scheibel, M. E., Lindsay, R. D., Tomiyasu, U., & Scheibel, A. B. (1976). Progressive dendritic changes in the aging human limbic system. *Experimental Neurology*, 53(2), 420–430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/976409>
- Schlossmann, J., Feil, R., & Hofmann, F. (2003). Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Annals of Medicine*, 35(1), 21–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12693609>
- Schlossmann, J., Feil, R., & Hofmann, F. (2005). Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 10, 1279–1289. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15769624>
- Schmidt, M. J., & Thornberry, J. F. (1978). Cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in vitro in brain regions of young, old and aged rats. *Brain Research*, 139(1), 169–177. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/202373>
- Schnecko, A., Witte, K., Bohl, J., Ohm, T., & Lemmer, B. (1994). Adenyllyl cyclase activity in Alzheimer's disease brain: stimulatory and inhibitory signal transduction pathways are differently affected. *Brain Research*, 644(2), 291–296. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7914148>
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*, 38(12), 3549–3558. <https://doi.org/10.1021/bi981874p>
- Schuman, E. M., & Madison, D. V. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5037), 1503–1506. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720572>
- Sebastiani, G., Morissette, C., Lagacé, C., Boulé, M., Ouellette, M.-J., McLaughlin, R. W., ... Tremblay, P. (2006). The cAMP-specific phosphodiesterase 4B mediates Abeta-induced microglial activation. *Neurobiology of Aging*, 27(5), 691–701. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.03.024>
- Sekhar, K. R., Hatchett, R. J., Shabb, J. B., Wolfe, L., Francis, S. H., Wells, J. N., ... Corbin, J. D. (1992). Relaxation of pig coronary arteries by new and potent cGMP analogs that selectively activate type I alpha, compared with type I beta, cGMP-dependent protein kinase. *Molecular Pharmacology*, 42(1), 103–108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321950>
- Selkoe, D. J. (1994). Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 489–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.002421>
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594), 789–791. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>

- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research*, *192*(1), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.016>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., ... Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, *14*(8), 837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>
- Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual Review of Biochemistry*, *68*, 821–861. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.821>
- Sheng, M., Thompson, M. A., & Greenberg, M. E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science (New York, N.Y.)*, *252*(5011), 1427–1430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646483>
- Shi, J., Qian, W., Yin, X., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gu, X., ... Liu, F. (2011). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the alternative splicing of tau exon 10: a mechanism involved in tau pathology of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(16), 14639–14648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204453>
- Shoji, M., & Kanai, M. (2001). Cerebrospinal fluid Aβ40 and Aβ42: Natural course and clinical usefulness. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *3*(3), 313–321. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387626>
- Sierksma, A. S. R., Rutten, K., Sydlík, S., Rostamian, S., Steinbusch, H. W. M., van den Hove, D. L. A., & Prickaerts, J. (2013). Chronic phosphodiesterase type 2 inhibition improves memory in the APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, *64*, 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.048>
- Sierksma, A. S. R., van den Hove, D. L. A., Pfau, F., Philippens, M., Bruno, O., Fedele, E., ... Prickaerts, J. (2014). Improvement of spatial memory function in APPsw/PS1dE9 mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D. *Neuropharmacology*, *77*, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.015>
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annual Review of Neuroscience*, *21*, 127–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.127>
- Simons, M., Ikonen, E., Tienari, P. J., Cid-Arregui, A., Mönning, U., Beyreuther, K., & Dotti, C. G. (1995). Intracellular routing of human amyloid protein precursor: axonal delivery followed by transport to the dendrites. *Journal of Neuroscience Research*, *41*(1), 121–128. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410114>
- Simons, M., Tienari, P. J., Dotti, C. G., & Beyreuther, K. (1995). Two-dimensional gel mapping of the processing of the human amyloid precursor protein in rat hippocampal neurons. *FEBS Letters*, *368*(2), 363–366. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628638>
- Sisodia, S. S., & St George-Hyslop, P. H. (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(4), 281–290. <https://doi.org/10.1038/nrn785>
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., ... Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature Neuroscience*, *8*(8), 1051–1058. <https://doi.org/10.1038/nn1503>
- Sontag, J.-M., Nunbhakdi-Craig, V., Montgomery, L., Arning, E., Bottiglieri, T., & Sontag, E. (2008). Folate deficiency induces in vitro and mouse brain region-specific downregulation of leucine carboxyl methyltransferase-1 and protein phosphatase 2A B(alpha) subunit expression that correlate with enhanced tau phosphorylation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(45), 11477–11487. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2816-08.2008>
- Spires-Jones, T. L., Kopeikina, K. J., Koffie, R. M., de Calignon, A., & Hyman, B. T. (2011). Are tangles as toxic as they look? *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *45*(3), 438–444. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9566-7>
- Sugawa, M., & May, T. (1994). Signal transduction in aging. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *19 Suppl 1*, 235–246. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649864>
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégar, S., Loyens, A., Talahari, S., ... Galas, M.-C. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4566–4575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>
- Swanson, T. L., Knittel, L. M., Coate, T. M., Farley, S. M., Snyder, M. A., & Copenhaver, P. F. (2005). The insect homologue of the amyloid precursor protein interacts with the heterotrimeric G protein Go alpha in an identified population of migratory neurons. *Developmental Biology*, *288*(1), 160–178. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.029>
- Sweatt, J. D. (2010). Neuroscience. Epigenetics and cognitive aging. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5979), 701–702. <https://doi.org/10.1126/science.1189968>
- Szodrai, A., Kuan, Y.-H., Hunzelmann, S., Engel, U., Sakane, A., Sasaki, T., ... Kins, S. (2009). APP anterograde transport requires Rab3A GTPase activity for assembly of the transport vesicle. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(46), 14534–14544. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1546-09.2009>
- Tai, S.-Y., Chien, C.-Y., Chang, Y.-H., & Yang, Y.-H. (2017). Cilostazol Use Is Associated with Reduced Risk of Dementia: A Nationwide Cohort Study. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *14*(3), 784–791. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0512-4>
- Takahashi, M., Miyata, H., Kametani, F., Nonaka, T., Akiyama, H., Hisanaga, S., & Hasegawa, M. (2015). Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathologica*, *129*(6), 895–907. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1415-2>
- Takeda, S., Wegmann, S., Cho, H., DeVos, S. L., Commins, C., Roe, A. D., ... Hyman, B. T. (2015). Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nature Communications*, *6*, 8490. <https://doi.org/10.1038/ncomms9490>
- Taler, V., & Phillips, N. A. (2008). Language performance in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a comparative review. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, *30*(5), 501–556. <https://doi.org/10.1080/13803390701550128>
- Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., ... Neve, R. L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science (New York, N.Y.)*, *235*(4791), 880–884. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2949367>
- Tarkowski, E., Andreassen, N., Tarkowski, A., & Blennow, K. (2003). Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *74*(9), 1200–1205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933918>
- Taubenfeld, S. M., Wiig, K. A., Monti, B., Dolan, B., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2001). Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(1), 84–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150323>
- Teich, A. F., Nicholls, R. E., Puzzo, D., Fiorito, J., Purgatorio, R., Fa' M., & Arancio, O. (2015). Synaptic therapy in Alzheimer's disease: a CREB-centric approach. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *12*(1), 29–41.

- <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0327-5>
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., ... Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, *30*(4), 572–580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(44), 29615–29619. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Thompson, P. M., Hayashi, K. M., de Zubicaray, G., Janke, A. L., Rose, S. E., Semple, J., ... Toga, A. W. (2003). Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(3), 994–1005. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574429>
- Tienari, P. J., De Strooper, B., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Czech, C., ... Dotti, C. G. (1996). The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *The EMBO Journal*, *15*(19), 5218–5229. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895567>
- Titus, D. J., Furones, C., Kang, Y., & Atkins, C. M. (2013). Age-dependent alterations in cAMP signaling contribute to synaptic plasticity deficits following traumatic brain injury. *Neuroscience*, *231*, 182–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.002>
- Torroja, L., Packard, M., Gorczyca, M., White, K., & Budnik, V. (1999). The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(18), 7793–7803. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10479682>
- Tran, H. T., LaFerla, F. M., Holtzman, D. M., & Brody, D. L. (2011). Controlled cortical impact traumatic brain injury in 3xTg-AD mice causes acute intra-axonal amyloid- β accumulation and independently accelerates the development of tau abnormalities. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(26), 9513–9525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0858-11.2011>
- Troquier, L., Caillierez, R., Burnouf, S., Fernandez-Gomez, F. J., Grosjean, M.-E., Zommer, N., ... Bucee, L. (2012). Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Current Alzheimer Research*, *9*(4), 397–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22272619>
- Tully, T. (1997). Regulation of gene expression and its role in long-term memory and synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9), 4239–4241. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113972>
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*, *70*(1), 1–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927332>
- Tyan, S.-H., Shih, A. Y.-J., Walsh, J. J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., ... Dickstein, D. L. (2012). Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *51*(1–2), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.009>
- Ueda, K., Yagami, T., Kageyama, H., & Kawasaki, K. (1996). Protein kinase inhibitor attenuates apoptotic cell death induced by amyloid beta protein in culture of the rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, *203*(3), 175–178. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742021>
- Ugarte, A., Gil-Bea, F., García-Barroso, C., Cedazo-Minguez, Á., Ramírez, M. J., Franco, R., ... Cuadrado-Tejedor, M. (2015). Decreased levels of guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP) in cerebrospinal fluid (CSF) are associated with cognitive decline and amyloid pathology in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *41*(4), 471–482. <https://doi.org/10.1111/nan.12203>
- Van Dam, D., & De Deyn, P. P. (2017). Non human primate models for Alzheimer's disease-related research and drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *12*(2), 187–200. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1271320>
- van der Kant, R., & Goldstein, L. S. B. (2015). Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Developmental Cell*, *32*(4), 502–515. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>
- van Eersel, J., Ke, Y. D., Liu, X., Delerue, F., Kril, J. J., Götz, J., & Ittner, L. M. (2010). Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(31), 13888–13893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009038107>
- Vandesquille, M., Baudonnat, M., Decorte, L., Louis, C., Lestage, P., & Béracocheá, D. (2013). Working memory deficits and related disinhibition of the cAMP/PKA/CREB are alleviated by prefrontal $\alpha\beta 2^*$ -nAChRs stimulation in aged mice. *Neurobiology of Aging*, *34*(6), 1599–1609. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.006>
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., ... Galas, M.-C. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 84. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>
- Viosca, J., Lopez de Armentia, M., Jancic, D., & Barco, A. (2009). Enhanced CREB-dependent gene expression increases the excitability of neurons in the basal amygdala and primes the consolidation of contextual and cued fear memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *16*(3), 193–197. <https://doi.org/10.1101/lm.1254209>
- Viosca, J., Malleret, G., Bourthouladze, R., Benito, E., Vronskava, S., Kandel, E. R., & Barco, A. (2009). Chronic enhancement of CREB activity in the hippocampus interferes with the retrieval of spatial information. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *16*(3), 198–209. <https://doi.org/10.1101/lm.1220309>
- Vitolo, O. V., Sant'Angelo, A., Costanzo, V., Battaglia, F., Arancio, O., & Shelanski, M. (2002). Amyloid beta-peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 13217–13221. <https://doi.org/10.1073/pnas.172504199>
- Waldemar, G., Dubois, B., Emre, M., Georges, J., McKeith, I. G., Rossor, M., ... EFNS. (2007). Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *European Journal of Neurology*, *14*(1), e1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01605.x>
- Walker, W. H., & Habener, J. F. (n.d.). Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *7*(4), 133–138. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406739>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfé, M. S., ... Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, *416*(6880), 535–539. <https://doi.org/10.1038/416535a>
- Wang, H., Xu, Y., Yan, J., Zhao, X., Sun, X., Zhang, Y., ... Zhu, C. (2009). Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced cell injury. *Brain Research*, *1283*, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.101>
- Wang, J.-Z., Gao, X., & Wang, Z.-H. (2014). The physiology and pathology of microtubule-associated protein tau. *Essays in Biochemistry*, *56*, 111–123. <https://doi.org/10.1042/bse0560111>
- Wang, J. Z., Gong, C. X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1995). Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(9), 4854–4860. Retrieved from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7876258>
- Wang, M., Gamo, N. J., Yang, Y., Jin, L. E., Wang, X.-J., Laubach, M., ... Arnsten, A. F. T. (2011). Neuronal basis of age-related working memory decline. *Nature*, *476*(7359), 210–213. <https://doi.org/10.1038/nature10243>
- Wang, Q.-W., Rowan, M. J., & Anwyl, R. (2009). Inhibition of LTP by beta-amyloid is prevented by activation of beta2 adrenoceptors and stimulation of the cAMP/PKA signalling pathway. *Neurobiology of Aging*, *30*(10), 1608–1613. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.004>
- Wang, Y., & Ha, Y. (2004). The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Molecular Cell*, *15*(3), 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.037>
- Wang, Y., & Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews. Neuroscience*, *17*(1), 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Wasco, W., Gurubhagavata, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., ... Tanzi, R. E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nature Genetics*, *5*(1), 95–100. <https://doi.org/10.1038/ng0993-95>
- Watanabe, A., Hong, W.-K., Dohmae, N., Takio, K., Morishima-Kawashima, M., & Ihara, Y. (2004). Molecular aging of tau: disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry*, *90*(6), 1302–1311. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02611.x>
- Weeber, E. J., & Sweatt, J. D. (2002). Molecular neurobiology of human cognition. *Neuron*, *33*(6), 845–848. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11906692>
- Welander, H., Frånberg, J., Graff, C., Sundström, E., Winblad, B., & Tjernberg, L. O. (2009). Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *Journal of Neurochemistry*, *110*(2), 697–706. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06170.x>
- West, A. E., Chen, W. G., Dalva, M. B., Dolmetsch, R. E., Kornhauser, J. M., Shaywitz, A. J., ... Greenberg, M. E. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20), 11024–11031. <https://doi.org/10.1073/pnas.191352298>
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., & Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, *344*(8925), 769–772. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7916070>
- Whishaw, I. Q., Metz, G. A., Kolb, B., & Pellis, S. M. (2001). Accelerated nervous system development contributes to behavioral efficiency in the laboratory mouse: a behavioral review and theoretical proposal. *Developmental Psychobiology*, *39*(3), 151–170. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745309>
- Whitehouse, P. J., Struble, R. G., Clark, A. W., & Price, D. L. (1982). Alzheimer disease: plaques, tangles, and the basal forebrain. *Annals of Neurology*, *12*(5), 494. <https://doi.org/10.1002/ana.410120517>
- Whitwell, J. L., Przybelski, S. A., Weigand, S. D., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Petersen, R. C., & Jack, C. R. (2007). 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, *130*(Pt 7), 1777–1786. <https://doi.org/10.1093/brain/awm112>
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., ... Haass, C. (2015). η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, *526*(7573), 443–447. <https://doi.org/10.1038/nature14864>
- Wilson, R. S., Barral, S., Lee, J. H., Leurgans, S. E., Foroud, T. M., Sweet, R. A., ... Bennett, D. A. (2011). Heritability of different forms of memory in the Late Onset Alzheimer's Disease Family Study. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *23*(2), 249–255. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101515>
- Wirtz-Brugger, F., & Giovanni, A. (2000). Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate mediated inhibition of cell death induced by nerve growth factor withdrawal and beta-amyloid: protective effects of propentofylline. *Neuroscience*, *99*(4), 737–750. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974437>
- Wischik, C. M., Staff, R. T., Wischik, D. J., Bentham, P., Murray, A. D., Storey, J. M. D., ... Harrington, C. R. (2015). Tau aggregation inhibitor therapy: an exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *44*(2), 705–720. <https://doi.org/10.3233/JAD-142874>
- Wu, J. W., Herman, M., Liu, L., Simoes, S., Acker, C. M., Figueroa, H., ... Duff, K. E. (2013). Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(3), 1856–1870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528>
- Wu, X., & McMurray, C. T. (2001). Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(3), 1735–1741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006727200>
- Xie, M., Li, Y., Wang, S.-H., Yu, Q.-T., Meng, X., & Liao, X.-M. (2017). The Involvement of NR2B and tau Protein in MG132-Induced CREB Dephosphorylation. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *62*(2), 154–162. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0919-8>
- Xing, J., Ginty, D. D., & Greenberg, M. E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *273*(5277), 959–963. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8688081>
- Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H., ... Holtzman, D. M. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(3), 387–393. <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>
- Yamamoto-Sasaki, M., Ozawa, H., Saito, T., Rösler, M., & Riederer, P. (1999). Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Research*, *824*(2), 300–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10196463>
- Yamamoto, M., Ozawa, H., Saito, T., Hatta, S., Riederer, P., & Takahata, N. (1997). Ca²⁺/CaM-sensitive adenylyl cyclase activity is decreased in the Alzheimer's brain: possible relation to type I adenylyl cyclase. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *104*(6–7), 721–732. <https://doi.org/10.1007/BF01291889>
- Yamazaki, M., Nakano, I., Imazu, O., & Terashi, A. (1995). Paired helical filaments and straight tubules in astrocytes: an electron microscopic study in dementia of the Alzheimer type. *Acta Neuropathologica*, *90*(1), 31–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7572076>
- Yan, S., Tu, Z., Liu, Z., Fan, N., Yang, H., Yang, S., ... Li, X.-J. (2018). A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell*, *173*(4), 989–1002.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.005>
- Yanai, S., Toyohara, J., Ishiwata, K., Ito, H., & Endo, S. (2017). Long-term cilostazol administration ameliorates memory decline in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) through a dual effect on cAMP and blood-brain barrier. *Neuropharmacology*, *116*, 247–259. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.12.006>
- Yang, Y., Yang, X.-F., Wang, Y.-P., Tian, Q., Wang, X.-C., Li, H.-L., ... Wang, J.-Z. (2007). Inhibition of protein phosphatases induces transport deficits and axonopathy. *Journal of Neurochemistry*, *102*(3), 878–886. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04603.x>
- Yew, D. T., Wong, H. W., Li, W. P., Lai, H. W., & Yu, W. H. (1999). Nitric oxide synthase neurons in different areas of normal aged and

- Alzheimer's brains. *Neuroscience*, 89(3), 675–686. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10199604>
- Yin, J. C., Del Vecchio, M., Zhou, H., & Tully, T. (1995). CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell*, 81(1), 107–115. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7720066>
- Yin, J. C., Wallach, J. S., Del Vecchio, M., Wilder, E. L., Zhou, H., Quinn, W. G., & Tully, T. (1994). Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*, 79(1), 49–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923376>
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., ... Lee, V. M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, 53(3), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010>
- Yu, F., Zhang, Y., & Chuang, D.-M. (2012). Lithium reduces BACE1 overexpression, β amyloid accumulation, and spatial learning deficits in mice with traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 29(13), 2342–2351. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2449>
- Yu, X.-W., Curlik, D. M., Oh, M. M., Yin, J. C., & Disterhoft, J. F. (2017). CREB overexpression in dorsal CA1 ameliorates long-term memory deficits in aged rats. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.19358>
- Yuzwa, S. A., Cheung, A. H., Okon, M., McIntosh, L. P., & Vocadlo, D. J. (2014). O-GlcNAc modification of tau directly inhibits its aggregation without perturbing the conformational properties of tau monomers. *Journal of Molecular Biology*, 426(8), 1736–1752. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.01.004>
- Zhang, B., Carroll, J., Trojanowski, J. Q., Yao, Y., Iba, M., Potuzak, J. S., ... Brunden, K. R. (2012). The microtubule-stabilizing agent, epothilone D, reduces axonal dysfunction, neurotoxicity, cognitive deficits, and Alzheimer-like pathology in an interventional study with aged tau transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(11), 3601–3611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4922-11.2012>
- Zhang, Y., Wang, R., Liu, Q., Zhang, H., Liao, F.-F., & Xu, H. (2007). Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10613–10618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703903104>
- Zhang, Z.-H., Fang, X.-B., Xi, G.-M., Li, W.-C., Ling, H.-Y., & Qu, P. (2010). Calcitonin gene-related peptide enhances CREB phosphorylation and attenuates tau protein phosphorylation in rat brain during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 64(6), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.06.009>
- Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Su Kang, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., ... Ye, K. (2015). Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 6, 8762. <https://doi.org/10.1038/ncomms9762>
- Zhao, Q.-F., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). S-Nitrosylation in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 268–280. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8672-2>
- Zheng-Fischhöfer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Illenberger, S., Godemann, R., & Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *European Journal of Biochemistry*, 252(3), 542–552. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546672>
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., ... Van der Ploeg, L. H. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, 81(4), 525–531. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758106>
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*, 1, 5. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-5>
- Zilka, N., Filipcik, P., Koson, P., Fialova, L., Skrabana, R., Zilkova, M., ... Novak, M. (2006). Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Letters*, 580(15), 3582–3588. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.029>
- Zimmerman, I., & Berg, A. (1974). Levels of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the cerebral cortex of aging rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 3(1), 33–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4368865>