



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO - BICOCCA

Scuola di Medicina e Chirurgia

Corso di dottorato in Neuroscienze XXVI ciclo

Effetti della deprivazione di ossigeno e glucosio
(OGD) sulla fluidità di membrana e sulla
modulazione dell'attività di BACE1 in cellule
endoteliali del microcircolo cerebrale di ratto
(RBE4)

Tutor: Dott.ssa Alessandra Bulbarelli

Tesi di Dottorato
in Neuroscienze

Dott.ssa Anna Brambilla

Anno Accademico 2012/2013

“Every great scientific truth goes through three stages.

***First, people say it conflicts with the Bible.
Next they say it had been discovered before.
Lastly they say they always believed it.”***

Louis Agassiz

INDICE

RIASSUNTO	Pag. 7
SUMMARY	Pag. 10
INTRODUZIONE	Pag. 13
1 La BARRIERA EMATOENCEFALICA	Pag. 13
1.1 Modello <i>in vitro</i> di BEE: cellule immortalizzate di endotelio cerebrale di ratto (RBE4)	Pag. 14
2 MEMBRANE BIOLOGICHE	Pag. 16
2.1 Lipidi di membrana	Pag. 16
2.1.1 Glicerofosfolipidi	Pag. 17
2.1.2 Sfingolipidi	Pag. 17
2.1.3 Colesterolo	Pag. 18
2.2 Proteine di membrana	Pag. 19
2.2.1 Proteine integrali di membrana	Pag. 19
2.2.2 Proteine periferiche associate alla membrana	Pag. 20
2.3 Carboidrati di membrana	Pag. 21
3 FLUIDITA' di MEMBRANA	Pag. 22

3.1 Lipid rafts	Pag. 22
4 EVENTO IPOSSICO/ISCHEMICO	Pag. 25
4.1 Ischemia cerebrale e BEE	Pag. 25
5 LIPIDI e ISCHEMIA CEREBRALE	Pag. 27
6 ALZHEIMER	Pag. 29
6.1 APP: sintesi, maturazione e processamento	Pag. 30
6.2 BACE1	Pag. 31
6.3 Danno cerebrovascolare e AD	Pag. 32
7 LIPIDI e AD	Pag. 34
7.1 Glicerofosfolipidi e AD	Pag. 34
7.2 Sfingolipidi e AD	Pag. 35
7.3 Colesterolo e AD	Pag. 37
7.3.1 Colesterolo e processamento di APP	Pag. 37
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 39
MATERIALI	Pag. 41
APPARECCHIATURE	Pag. 42

METODI	Pag. 43
8 Linea cellulare RBE4	Pag. 43
9 Deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD)	Pag. 44
10 Saggio di vitalità cellulare: MTT	Pag. 45
11 Frazionamento cellulare ed estrazione dei microsomi di membrana	Pag. 46
12 Separazione frazioni di membrana TRITON X-100 solubili (TS) e TRITON X-100 insolubili (TI)	Pag. 47
13 Estrazione lipidi	Pag. 48
14 Valutazione della fluidità di membrana	Pag. 49
15 Dosaggio proteico (BCA)	Pag. 50
16 Cromatografia su strato sottile (TLC)	Pag. 51
17 Dosaggio acido sialico (metodo di Svennerholm)	Pag. 53
18 Dosaggio fosforo fosfolipidico (metodo di Bartlett)	Pag. 54
19 Dosaggio colesterolo totale e CL	Pag. 55
20 Dosaggio dell'attività di BACE1	Pag. 56
21 Separazione elettroforetica	Pag. 57
22 Trasferimento su nitrocellulosa, immunodecorazione e rivelazione con chemiluminescenza	Pag. 59

RISULTATI	Pag. 61
23 Valutazione della vitalità cellulare in seguito a deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) in cellule RBE4	Pag. 61
24 Analisi dei livelli di espressione dei fosfolipidi (FL) di membrana in cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD	Pag. 62
25 Valutazione dei livelli di espressione dei gangliosidi (GG) di membrana in cellule RBE4 dopo OGD	Pag. 63
26 Effetto del trattamento OGD sui livelli di colesterolo libero (CL) di membrana in cellule RBE4	Pag. 65
27 Analisi dei livelli di CL e colesterolo esterificato (CE) in cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD	Pag. 66
28 Valutazione della fluidità di membrana delle cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD	Pag. 67
29 Dosaggio dell'attività della β-secretasi (BACE1) e valutazione dei livelli di espressione delle proteine APP e BACE1 in cellule RBE4 in risposta a OGD	Pag. 68
30 Analisi dell'attività di BACE1 e della localizzazione delle proteine APP e BACE1 in frazioni TRITON X-100 solubili (TS) e TRITON X-100 insolubili (TI) di membrana in risposta ad OGD	Pag. 70
31 Effetto del trattamento OGD sulla localizzazione di CL in frazioni TS e TI di membrana in cellule RBE4	Pag. 73
32 Effetto del trattamento OGD sui livelli di espressione delle proteine cPLA2 e COX2	Pag. 74
DISCUSSIONE	Pag. 75
BIBLIOGRAFIA	Pag. 85
PUBBLICAZIONI	Pag. 106
RINGRAZIAMENTI	Pag. 107

RIASSUNTO

La barriera ematoencefalica (BEE) costituisce l'interfaccia tra l'encefalo e il torrente ematico e garantisce il corretto funzionamento del sistema nervoso centrale (SNC) mantenendo l'omeostasi cerebrale entro ristretti limiti fisiologici. Infatti, a livello delle cellule endoteliali di barriera, la presenza di un elevato numero di giunzioni strette (tight junctions, TJ) e l'espressione asimmetrica di specifici trasportatori di membrana assicura una fine regolazione del flusso di sostanze in entrata e in uscita dall'encefalo [Enciu et al., 2013; Lakhan et al., 2013; Abbott and Friedman, 2012; Wolburg et al., 2009; Hawkins and Davis, 2005; Ballabh et Al., 2004]. Alla modulazione della permeabilità della BEE partecipano, inoltre, porzioni eterogenee di membrana arricchite in colesterolo e sfingolipidi di dimensioni comprese tra 10 e 200nm, definite microdomini o lipid rafts [Di Paolo and Kim, 2011; Rushworth and Hooper, 2010; Lingwood and Simmons, 2010; Patel and Insel, 2009; Wennekes et al., 2009].

Poiché la BEE garantisce il mantenimento dell'omeostasi cerebrale, condizioni che ne alterano la struttura o la funzionalità risultano cruciali nello sviluppo e nella progressione di alcune delle patologie che colpiscono il SNC [Sagare et al., 2012; Grinberg et al., 2012; Jeynes and Provias, 2011].

È noto che l'ischemia cerebrale danneggia la BEE poiché promuove l'aumento della permeabilità paracellulare e la perdita diffusa di sostanze attraverso la parete vasale per effetto della rottura delle giunzioni strette [Lakhan et al., 2013; Jablonski et al., 2011; An and Xue, 2009; Pluta and Ulamek, 2008; Koto et al., 2007]. In aggiunta, l'evento ischemico compromette i meccanismi di autoregolazione del flusso ematico, determinando vasocostrizione ed ipoperfusione [Lin and Perez-Pinzon, 2013; Pluta and Ulamek, 2008].

È stato, inoltre, osservato un aumentato rischio di insorgenza della malattia di Alzheimer (AD) in pazienti che hanno subito ricorrenti episodi ischemici e sebbene i meccanismi molecolari non siano ancora stati completamente chiariti, è stata dimostrata una correlazione fisiopatologica con il metabolismo della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP) [Guglielmotto et al., 2009;].

In modelli neuronali, infatti, le condizioni ischemiche promuovono il processamento di APP mediato dalla β -secretasi (BACE1) e la conseguente produzione di peptide amiloide ($A\beta_{42}$) [Guglielmotto et al., 2009; Zhang et al., 2007; Xue et al., 2006; Sun et al., 2006] e recentemente, è stato dimostrato un aumento dei livelli di $A\beta_{42}$ in risposta a condizioni ischemiche anche in un modello cellulare di BEE [Bulbarelli et al., 2012].

L'intorno lipidico in cui sono immerse sia la proteina APP sia le secretasi, oltre a svolgere un importante ruolo nel mantenimento delle proprietà della BEE [Dodelet-Devillers et al., 2009;

Wolburg et al., 2009; Sugibayashi et al., 2009; McCaffrey et al., 2007], partecipa alla modulazione della produzione di $A\beta_{42}$ [Sathya et al., 2012; Zhang et al., 2011; Di Paolo and Kim, 2011; Vestergaard et al., 2010]. Ciononostante i dati relativi l'influenza delle condizioni ischemiche sui livelli di espressione dei lipidi di membrana nel distretto vascolare cerebrale non sono del tutto chiari [Maulik et al., 2012; Di paolo and Kim, 2011; Verstergaard et al., 2010; Wennekes et al., 2009].

Pertanto, il presente lavoro si prefigge di valutare, in cellule endoteliali di BEE, il ruolo delle modificazioni lipidiche indotte da condizioni ischemiche, allo scopo di individuare una possibile correlazione con l'aumento dei livelli di $A\beta_{42}$, [Bulbarelli et al., 2012]. La linea cellulare RBE4 (cellule endoteliali del microcircolo cerebrale di ratto) è stata utilizzata come modello *in vitro* di BEE e le condizioni ischemiche sono state mimate avvalendoci di un protocollo di deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) già in uso presso il laboratorio [Bulbarelli et al., 2012].

Le analisi sono state condotte dopo 1 e 24 ore di ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche ed i risultati ottenuti mostrano, la riduzione dei livelli di espressione di GM2 e GM3, l'aumento dei livelli di colesterolo libero (CL) e la concomitante riduzione dei livelli di colesterolo esterificato (CE). L'accumulo di CL in membrana, oltre a determinarne una diminuzione nella fluidità, promuove significativamente l'attività di BACE1 (45%). In più, le alterazioni lipidiche di membrana indotte dal trattamento sembrano favorire, in cellule RBE4, uno spostamento delle proteine APP e BACE1 dai microdomini ed una loro rilocalizzazione nelle porzioni non rafts di membrana. Queste evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo dell'evento ischemico nella modulazione dei lipidi delle cellule di barriera che potrebbe spiegare almeno in parte l'attivazione di meccanismi correlati alla produzione di peptide $A\beta_{42}$ e già osservati presso il laboratorio [Bulbarelli et al., 2012].

Inoltre, differentemente da quanto riportato in letteratura [Keleshian et al., 2013; Gentile et al., 2012; Schonfeld et al., 2011; Espenshade and Hughes, 2007]. nel nostro modello sperimentale il trattamento non determina una riduzione dei quantitativi dei FL. Abbiamo, pertanto, ipotizzato che gli acidi grassi (AG) liberati per idrolisi dal CE possano essere riutilizzati dalla cellula in sostituzione di quelli rilasciati dai FL per una sorta di meccanismo compensatorio.

È noto, infatti, che le condizioni ischemiche attivano la fosfolipasi A_2 citosolica ($cPLA_2$) promuovendo la sua rilocalizzazione in membrana dove catalizza l'idrolisi degli acidi grassi (AG) dai FL, con il conseguente rilascio di acido arachidonico (AA) in cellula. L'AA è il precursore di diversi mediatori del processo infiammatorio, alla cui sintesi partecipa la cicloossigenasi 2 (COX2) [Gentile et al., 2012; Rao et al., 2012; Kim et al., 2011; Fraser, 2011; Mbonye and Song, 2009].

Effettivamente, da quanto osservato in cellule RBE4, dopo il trattamento OGD l'espressione proteica di cPLA₂ nelle frazioni arricchite in membrane (MEF) aumenta, parallelamente all'incremento della proteina COX2, un marcatore di infiammazione [Heneka et al., 2010].

In conclusione, il diffuso aumento dei livelli di CL, (ovvero non localizzato in specifici domini di membrana), potrebbe rappresentare un "effetto collaterale" nella risposta all'evento ischemico, che portando all'attivazione catalitica di BACE1, favorirebbe la produzione di A β ₄₂.

Un meccanismo che, in un quadro più ampio, potrebbe nel tempo partecipare nel soggetto ischemico all'accumulo di peptide amiloide a livello di endotelio cerebrale, alterando strutturalmente e funzionalmente la BEE e risultando importante anche nell'insorgenza della patologia di Alzheimer.

TITLE

Oxygen and glucose deprivation (OGD) effect on membrane fluidity and BACE1 activity modulation in brain capillary endothelial (RBE4) cells

SUMMARY

Blood brain barrier (BBB) forms the interface between the central nervous system (CNS) and peripheral bloodstream and acting as selective barrier strictly regulates ion balance, nutrient transport, restricts potentially toxic molecules influx and assures the stable local environment essential for proper cerebral function [Abbott and Friedman, 2012].

In BBB endothelial cells the presence of many tight junctions (TJ) and the particularly stiff packing of membrane phospholipids (PL) and cholesterol permit the overall BBB integrity and selectivity: indeed, many metabolic substances are allowed to enter in cerebral district only through a highly regulated mechanism, mediated by specific membrane transporters [Enciu et al., 2013; Abbott and Friedman, 2012; Yang and Rosenberg, 2011; Wolburg et al., 2009; Dodelet-Devillers et al., 2009; McCaffrey et al., 2007].

Brain endothelial cell membrane is organized in structural and functional microdomains named rafts (small heterogeneous domains enriched in cholesterol and sphingolipids) [Rushworth and Hooper, 2010; Lingwood and Simmons, 2010] which are responsible for membrane compartmentalization, and, together with the presence of TJ, are referred as the site of BBB proper [Sagare et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Wolburg et al., 2009; McCaffrey et al., 2007].

Highlighting the importance of the vascular district in CNS homeostasis, alterations in BBB morphology and structural organization have been detected in numerous CNS illnesses, often associated to harmful conditions, such as infection, inflammation, hypoxia and stroke [Enciu et al., 2013; Lakhan et al., 2013; Abbott and Friedman, 2012; Kalaria et al., 2012].

In particular ischemia and reperfusion injuries, promoting inflammation, free radicals production and BBB impairment, are proved to play major roles in CNS pathologies, such as Alzheimer's disease (AD) [Enciu et al., 2013; Kalaria et al., 2012; Sagare et al., 2012; Abbott and Friedman, 2012; Jaynes and Provias, 2011; Iadecola, 2010; Pluta and Uramek, 2008; Hawkins and Davis, 2005].

It is already known that reduced brain blood perfusion [Ruitenbergh et al. 2005] and silent infarcts [Vermeer et al. 2003] increase the risk of AD [Kalaria et al., 2012; Sagare et al., 2012; Yang and

Rosenberg, 2011; Jeynes and Provias, 2011; Jablonski et al., 2011; Iadecola, 2010; Koto et al., 2007; Altgossion and Winblad, 2007]. Moreover it has been recently demonstrated, in an *in vitro* BBB model, that ischemic conditions promote the production of amyloid- β ($A\beta_{42}$) peptide, an AD neuropathological hallmark [Bulbarelli et al., 2012].

Membrane lipid composition, besides its role in maintaining BBB function, participates in modulation of Amyloid Precursor Protein (APP) processing mediated by β -secretase (BACE1) [Maulik et al., 2012; Zhang et al., 2011, Vestergaard et al., 2010; Kalvodova et al., 2005]. Nevertheless data about ischemic condition role in lipid changes in brain vascular cells are not completely understood.

Thus, we are interested to analyze endothelial lipid levels and membrane fluidity variations in response to ischemic conditions, in order to investigate their potential pathological correlation with $A\beta_{42}$ generation [Bulbarelli et al., 2012]. Brain capillary endothelial (RBE4) cell line as BBB *in vitro* model and oxygen and glucose deprivation (OGD) treatment mimicking ischemic conditions are employed. Experimental assessments are performed after 1 and 24 hours of normoxia and normoglycemia restoration. Results obtained show GM2 and GM3 levels reduction, free cholesterol (FC) amount increase and the concomitant decrease of cholesteryl esters (CE). FC membrane gather leads to a decrease in membrane fluidity and, interestingly, promotes BACE1 activity (45%). In addition, OGD treatment-induced lipid membrane alterations in RBE4 cells seem to favour a change in APP and BACE1 protein localization, towards non rafts domains. Thus, these experimental evidences suggest that lipid level changes, may contribute to molecular mechanisms leading to augmented $A\beta_{42}$ production induced by ischemic conditions [Bulbarelli et al., 2012].

In addition, in our experimental model, ischemic conditions do not promote a reduction in PL levels, differently to reports available in literature [Keleshian et al., 2013; Gentile et al., 2012; Schonfeld et al., 2011; Espenshade and Hughes, 2007; Ramirez et al., 2003]. Therefore, we speculate that fatty acids (FA) derived from CE hydrolysis might recycle in cell and replace FA released from membrane PL in a compensatory mechanism.

Indeed, it is known that hypoxia/ischemia activates cytosolic phospholipase A_2 (cPLA₂), promoting its localization towards cell membrane where it catalyzes FA hydrolysis from membrane lipids, leading to an augment of free arachidonic acid (AA), which is converted in inflammatory mediators by different enzymes including the cyclooxygenase 2 (COX2) [Gentile et al., 2012; Rao et al., 2012; Kim et al., 2011; Fraser, 2011; Mbonye and Song, 2009].

Actually, in response to OGD treatment, we observed the increase of both cPLA₂ protein levels in membrane fractions, and COX2 protein expression, a marker of inflammation [Heneka et al., 2010].

In conclusion, random FC increase in membrane (not localized in specific membrane domains) might be a side effect, resulting in BACE1 activation and A β ₄₂ production.

In a wider point of view, the mechanism here proposed might lead, in an ischemic patient, to brain endothelial amyloid peptide gather, impairing BBB integrity and functionality, eventually participating in AD etiological processes.

INTRODUZIONE

1. La BARRIERA EMATOENCEFALICA

Il sistema nervoso centrale (CNS) è uno dei distretti più complessi del corpo umano ed il suo corretto funzionamento richiede, oltre al mantenimento dell'omeostasi salina, una fine regolazione del flusso di sostanze sia in entrata che in uscita [Abbott and Friedman, 2012; Hawkins and Davis, 2005]. Gli elementi cellulari all'interfaccia tra il CNS e il torrente ematico svolgono questo importante ruolo costituendo complesse barriere fisiche, di trasporto, metaboliche ed immunologiche. La presenza di tali barriere è fondamentale poiché permettono la regolazione dell'entrata di sostanze utili nel distretto cerebrale, l'eliminazione di metaboliti di scarto e al contempo, impediscono l'ingresso di composti potenzialmente tossici e agenti neuroattivi o patogeni, regolando inoltre l'accesso dei globuli bianchi al cervello [Abbott and Friedman, 2012; Engerhardt and Coisne, 2011; Greenwood et al., 2011].

Le barriere che separano il CNS dalla periferia sono due: la barriera ematoliquorale (BCSFB), costituita dall'epitelio del plesso corioideo e della membrana aracnoidea e la barriera ematoencefalica (BEE), formata dall'endotelio della microvascolatura cerebrale [Abbott and Friedman, 2012; Shi et Al., 2008].

La BEE presenta un'organizzazione morfologica e strutturale estremamente specializzata che correla con il suo ruolo di elemento chiave nella regolazione dei trasporti da e verso il CNS, differenziandola in modo netto dalla vascolatura periferica. La comparsa delle caratteristiche di barriera e il loro mantenimento dipende dalle interazioni delle cellule endoteliali cerebrali con i componenti della matrice extracellulare (membrane basali) e con le cellule dell'unità neurovascolare (periciti, astrociti perivascolari e microglia) [Abbott and Friedman, 2012; Sagare et al., 2012; Armulik et al., 2010; Daneman et al., 2010; Bell and Zlokovic, 2009; Wolburg et al., 2009; Daneman et al., 2009; Liebner et al., 2008; McCaffrey et al., 2007; Stewart and Wiley, 1981]. A differenza dei vasi periferici, i capillari cerebrali sono privi di fenestrazioni e le cellule endoteliali che li costituiscono hanno un elevato numero di giunzioni strette (tight junctions, TJ) e di mitocondri ed una ridotta attività di pinocitosi. Queste caratteristiche, limitando la diffusione di soluti polari tra cellule adiacenti ("gate function"), permettono la fine modulazione del trasporto paracellulare [Abbott and Friedman, 2012; Hawkins and Davis, 2005; Ballabh et Al., 2004]. La presenza di TJ determina, inoltre, la polarizzazione delle cellule endoteliali grazie alla definizione dei domini di membrana apicali (rivolti verso il sangue) e basolaterali (rivolti verso il cervello) ("fence function") [Abbott and Friedman, 2012; Wolburg et al., 2009; McCaffrey et al., 2007].

L'espressione asimmetrica di trasportatori specifici sulle porzioni apicali e basolaterali partecipa alla regolazione del trasporto transcellulare [Abbott and Friedman, 2012; Hawkins and Davis, 2005; Ballabh et Al., 2004].

Le differenti porzioni di membrana presentano inoltre microdomini (“zattere lipidiche”) costituiti da una specifica composizione lipidica, che partecipano al mantenimento della polarizzazione cellulare, oltre a favorire la prossimità e la funzionalità delle proteine in essi residenti [Dodelet-Devillers et al., 2009; McCaffrey et al., 2007].

È stata recentemente proposta una classificazione dei microdomini (lipid rafts) di cellule endoteliali della BEE sulla base delle proteine espresse e della loro funzione:

- microdomini associati a proteine coinvolte nelle interazioni cellula-cellula (proteine che costituiscono le TJ) e cellula-matrice extracellulare (integrine), definiti “scaffoldind rafts”;
- microdomini coinvolti nell’adesione e nel reclutamento di cellule del sistema immunitario (caderine), definiti “adhesion rafts”;
- microdomini associati all’attività di trasporto delle cellule endoteliali, definiti “transporter rafts” [Dodelet-Devillers et al., 2009].

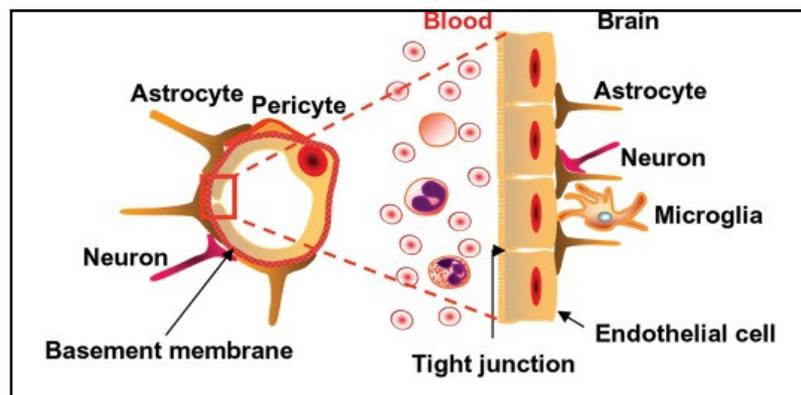


Figura 1. Rappresentazione schematica della sezione trasversale di un capillare del microcircolo cerebrale e dell'organizzazione delle interazioni tra cellule endoteliali e gli altri componenti dell'unità neurovascolare (periciti, astrociti perivascolari, cellule microgliali e neuroni) [Modificato da Saha et al., 2012].

1.1. Modello *in vitro* di BEE: cellule immortalizzate di endotelio cerebrale di ratto (RBE4)

Le prime evidenze sperimentali disponibili in letteratura sulla caratterizzazione della struttura e funzionalità della BEE sono state ottenute mediante studi *in vitro* condotti in cellule primarie di endotelio del microcircolo cerebrale cresciute in co-cultura con gli astrociti. Tali modelli cellulari si sono, tuttavia, rivelati di difficile gestione a causa degli alti costi di utilizzo, del veloce de-differenziamento cellulare e della presenza di contaminanti non endoteliali.

Sono, quindi, stati sviluppati modelli sperimentali alternativi, costituiti da linee cellulari endoteliali immortalizzate, tra cui le cellule RBE4 (rat brain endothelial cell line). Queste cellule non mostrano un fenotipo trasformato (mantengono infatti la capacità di crescere senza formare *foci*), esprimono proteine specifiche delle cellule endoteliali, come le molecole di adesione intercellulare (ICAM-1) e presentano le proprietà tipiche della BEE, come l'espressione di trasportatori per il glucosio e un'elevata resistenza transendoteliale.

Le cellule RBE4 costituiscono, pertanto, un valido modello, scientificamente accettato, per valutare *in vitro* i meccanismi di risposta dell'endotelio cerebrale [Balbuena et al., 2011; Wilhelm et al., 2011; Araùjo et al., 2010; Faria et al., 2010; Roux et Al., 2005].

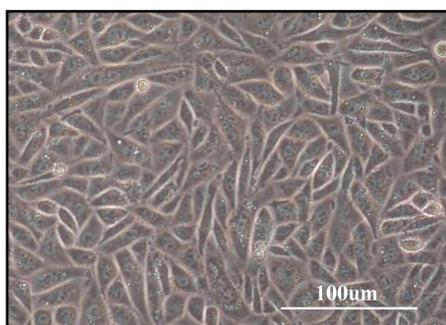


Figura 2. Immagine al microscopio ottico di cellule RBE4 (ingrandimento 10X).

2. MEMBRANE BIOLOGICHE

Le membrane biologiche svolgono importanti funzioni:

- preservano l'individualità della cellula, delimitandola e separandola dall'ambiente esterno e mantenendone forma e plasticità tramite le interazioni con il citoscheletro;
- costituiscono una barriera con permeabilità altamente selettiva;
- controllano il flusso di informazioni, regolando le interazioni con la matrice extracellulare e con le altre cellule e modulando il riconoscimento di segnali chimici e la loro trasduzione all'interno della cellula.

Oltre alla membrana plasmatica, le cellule eucariote presentano numerose membrane intracellulari che costituiscono e delimitano organuli intracellulari con funzioni specializzate (involucro nucleare, membrane mitocondriali, membrane del reticolo endoplasmatico, del Golgi, dei lisosomi, delle vescicole, etc..).

Le membrane biologiche hanno una composizione lipo-glico-proteica costituita per circa il 40% da lipidi, per il 50-55% da proteine e per il 5-8% da carboidrati. Come descritto più in dettaglio nei successivi paragrafi, le caratteristiche chimiche e funzionali dei componenti di membrana determinano la struttura e le proprietà specifiche delle membrane stesse [Cooper and Hausman, 2009; Adibhlata et al., 2008].

2.1.Lipidi di membrana

I lipidi di membrana sono molecole anfipatiche: possiedono, infatti, una porzione idrofila (testa polare) ed una porzione idrofobica (coda apolare). Poiché le code apolari tendono a minimizzare il loro contatto con l'acqua (effetto idrofobico), in ambiente acquoso i lipidi formano spontaneamente strutture come il doppio strato fosfolipidico o le micelle in cui solo le teste polari sono esposte all'acqua. Il doppio strato si forma quando l'area della sezione trasversale della testa polare è simile a quella della coda polare; quando invece l'area della sezione trasversale della testa è maggiore di quella della coda si formano le micelle [Cooper and Hausman, 2009; Adibhlata et al, 2008; Adibhlata and Hatcher, 2008].

I lipidi di membrana vengono generalmente suddivisi in tre categorie: i glicerofosfolipidi, gli sfingolipidi e il colesterolo [Cooper and Hausman, 2009].

2.1.1. Glicerofosfolipidi

I glicerofosfolipidi sono costituiti da una molecola di glicerolo esterificata con due molecole di acidi grassi (AG) e con un gruppo fosfato a sua volta legato ad un atomo di idrogeno (a formare l'acido fosfatidico) o ad un alcol (colina nella fosfatidilcolina, PC, etanolamina nella fosfatidiletanolamina, PE, etc..).

Nella membrana plasmatica cellulare, PC e PE sono i glicerofosfolipidi maggiormente espressi e rappresentano rispettivamente il 40-45% e il 35% dei lipidi totali; fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositolo (PI) sono espressi in quantità minori. Inoltre, la loro distribuzione nei due foglietti del doppio strato è asimmetrica: PC è presente soprattutto nel foglietto esterno della membrana, mentre PE e PS maggiormente nel foglietto interno [Cooper and Hausman, 2009; Adibhlata et al., 2008].

2.1.2. Sfingolipidi

Gli sfingolipidi sono ulteriormente raggruppati in sfingofosfolipidi e glicosfingolipidi.

Gli sfingofosfolipidi sono costituiti da sfingosina, un amminoalcol a lunga catena, legata con legame ammidico ad un AG e con legame esterico o glicosidico a un gruppo fosfato, a sua volta legato ad un atomo di idrogeno (ceramide, Cer) o alla colina (sfingomieline, SM) [Nelson and Cox, 2008].

I glicosfingolipidi sono costituiti da una molecola di sfingosina legata con legame ammidico ad un AG e con legame β -glicosidico a zuccheri semplici o gruppi oligosaccaridici (glucosio per il glucosilceramide, lattosio per il lattosilceramide, etc..).

Una classe specifica di glicosfingolipidi, i gangliosidi (GG), possiedono almeno un residuo di acido N-acetilneuroaminico (o sialico) legato in posizione 3 di una molecola di galattosio. Secondo la nomenclatura di Svennerholm, i GG vengono denominati con le seguenti lettere: G sta per ganglioside, A per asialo-, M per monosialo-, D per disialo- e T per trisialoganglioside. Specifiche sialil-transferasi convertono sequenzialmente il lattosilceramide in GM3, GD3 e GT3; questi GG agiscono, inoltre, da precursori per GG più complessi delle serie 0, a, b e c, che indicano il numero di residui di acido sialico (da nessuno a 3) legati in posizione 3 della molecola di galattosio. [Gangoiti et al., 2010; Wennekes et al., 2009; Cooper and Hausman, 2009]. I GG, disposti sul foglietto esterno della membrana plasmatica, sono coinvolti nei processi di riconoscimento/adesione della cellula e nella modulazione della trasduzione del segnale all'interno della cellula [Gangoiti et al., 2010; Wennekes et al., 2009].

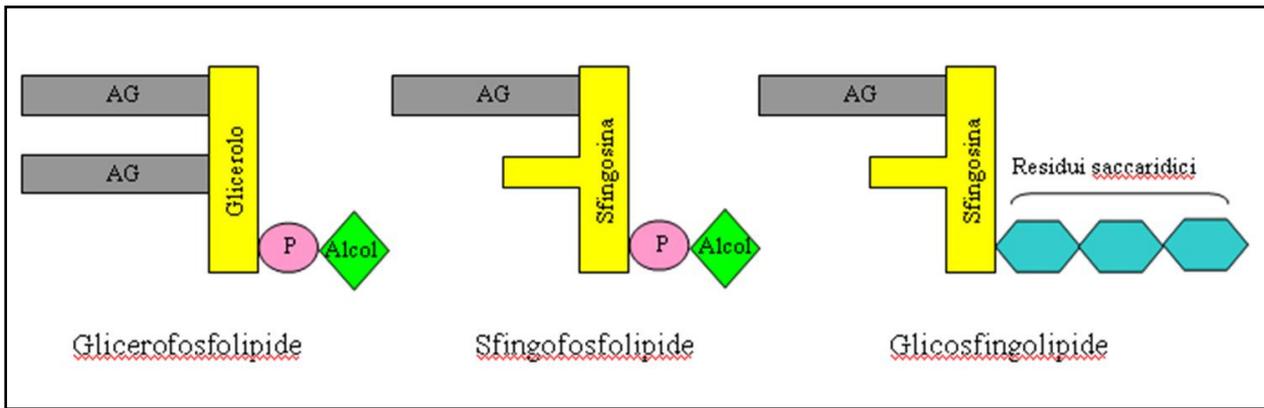


Figura. 3 Struttura schematica dei lipidi di membrana. P, gruppo fosfato, AG, acido grasso. [Modificato da Cooper and Hausman, 2009]

2.1.3. Colesterolo

Il colesterolo (CL) è un composto aliciclico costituito da 27 atomi di carbonio, organizzati in un nucleo di ciclopentanoperidrofenantrene, con un doppio legame tra C5 e C6, e una catena ramificata a 8 atomi di carbonio legata al C17. Il CL presenta inoltre un gruppo metile sul C10 e C13 e un gruppo ossidrilico sul C3, che conferisce alla molecola le sue caratteristiche anfipatiche.

La biosintesi del CL, come tutte le vie biosintetiche, richiede energia (ATP) e potere riducente (NADPH) ed è quindi finemente regolata, a livello della reazione catalizzata dall'enzima β -idrossi- β -metilglutarilCoA (HMGCoA) reductasi, dalla disponibilità energetica e dalla presenza in cellula di steroli [Chang et al., 2006].

Biochimicamente, 3 molecole di acetylCoA vengono convertite in fasi successive ad acetoacetylCoA e a HMGCoA, che viene ridotto a mevalonato. Da questo composto viene sintetizzato l'isopentenilCoA e, in seguito a condensazione testa-coda, il farnesilCoA fino alla formazione dello squalene, un composto a 30 atomi di carbonio. Differenti reazioni di ciclizzazione e rimodellamento della struttura carboniosa, con l'aggiunta di ossigeno e la rimozione di 3 gruppi metilici, portano alla sintesi di lanosterolo ed infine di CL [Nelson and Cox, 2008; Espenshade and Hughes, 2007; Chang et al., 2006].

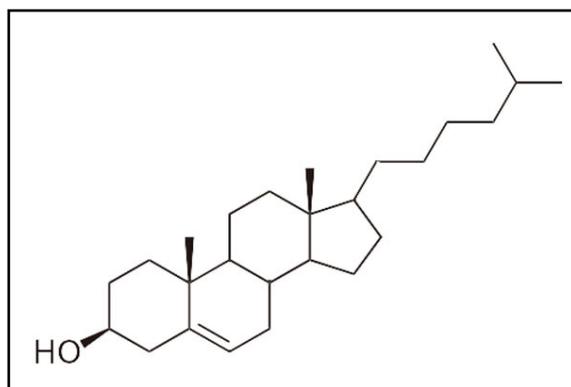


Figura 4. Struttura del CL [Modificato da Nelson and Cox, 2008].

2.2. Proteine di membrana

Come già detto, le proteine costituiscono circa il 50% della massa della membrana plasmatica. Poiché le dimensioni delle proteine sono maggiori rispetto a quelle dei lipidi, tale percentuale si traduce nel rapporto di una ogni 50 molecole lipidiche. Ogni tipo di membrana cellulare contiene una diversa serie di proteine, che correla con le specifiche funzioni che svolge [Cooper and Hausman, 2009].

Negli anni '70, Singer e Nicolson, hanno distinto due classi di proteine di membrana in base alle interazioni che esse instaurano con i lipidi del doppio strato e alle tecniche necessarie per la loro purificazione: le proteine integrali di membrana e le proteine periferiche associate alla membrana [Nicolson and Singer, 1972]. Utilizzando reagenti polari (soluzioni con pH estremi o ad alta concentrazione salina), infatti, le proteine periferiche si dissociano dalla membrana e diventano solubili senza danni alla struttura della membrana; al contrario, le proteine integrali di membrana possono essere estratte dal doppio strato fosfolipidico solo trattando con detergenti e danneggiando quindi la struttura della membrana [Cooper and Hausman, 2009; Nicolson and Singer, 1972]. Ad oggi, sulla base delle sempre più numerose informazioni ottenute questa classificazione è stata perfezionata e le proteine di membrana vengono classificate in: proteine intrinseche (o integrali) e proteine estrinseche (o periferiche).

2.2.1. Proteine integrali di membrana

Molte proteine integrali di membrana si estendono attraverso il doppio strato fosfolipidico e parte della loro massa sporge da entrambi i lati. Come i lipidi con cui vengono a contatto, queste proteine presentano sia regioni idrofiliche, esposte all'ambiente acquoso, sia idrofobiche ancorate alle code apolari dei fosfolipidi. Presentano, inoltre, un dominio transmembrana che corrisponde ad una

regione della catena polipeptidica costituita generalmente da 20-25 amminoacidi idrofobici organizzati in α -eliche.

L'utilizzo di detergenti, molecole anfipatiche dotate di una regione idrofilica ed una idrofobica, in eccesso rispetto al campione di membrane, consente l'estrazione delle proteine integrali di membrana. Infatti le regioni idrofobiche dei detergenti, avendo un'unica coda apolare tendono a legarsi alle regioni idrofobiche sia delle proteine sia dei fosfolipidi favorendo la separazione delle due componenti.

Le proteine integrali di membrana svolgono diverse funzioni:

- agiscono da recettori per segnali provenienti dall'ambiente esterno e trasducono il segnale all'interno della cellula;
- sono canali o trasportatori di ioni o metaboliti;
- sono enzimi;
- costituiscono giunzioni cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare [Cooper and Hausman, 2009].

2.2.2. Proteine periferiche associate alla membrana

Queste proteine si trovano interamente all'esterno del doppio strato fosfolipidico e sono ancorate tramite legami covalenti ad uno o più gruppi lipidici o tramite interazioni non covalenti con altre proteine di membrana.

Queste interazioni sono promosse da modificazioni post-traduzionali che includono l'aggiunta all'estremità N-terminale della proteina di un gruppo miristilico (14 atomi di carbonio), l'aggiunta di acido palmitico (16 atomi di carbonio) alle catene laterali di residui di cisteina ed il legame di gruppi prenili (15 o 20 atomi di carbonio) alle catene laterali di un residuo di cisteina posto all'estremità C-terminale della proteina. Spesso queste proteine hanno regioni cariche positivamente che possono interagire con le teste cariche negativamente di PE presente nel lato citosolico della membrana plasmatica. La maggior parte di queste proteine, come ad esempio Src e Ras, hanno un ruolo molto importante nelle vie di trasduzione del segnale. Proteine associate alla membrana dal lato extracellulare, invece, possiedono l'ancora di glicosilfosfoinositolo (GPI), che le mantiene associate al doppio strato fosfolipidico pur non avendo un dominio transmembrana canonico [Cooper and Hausman, 2009].

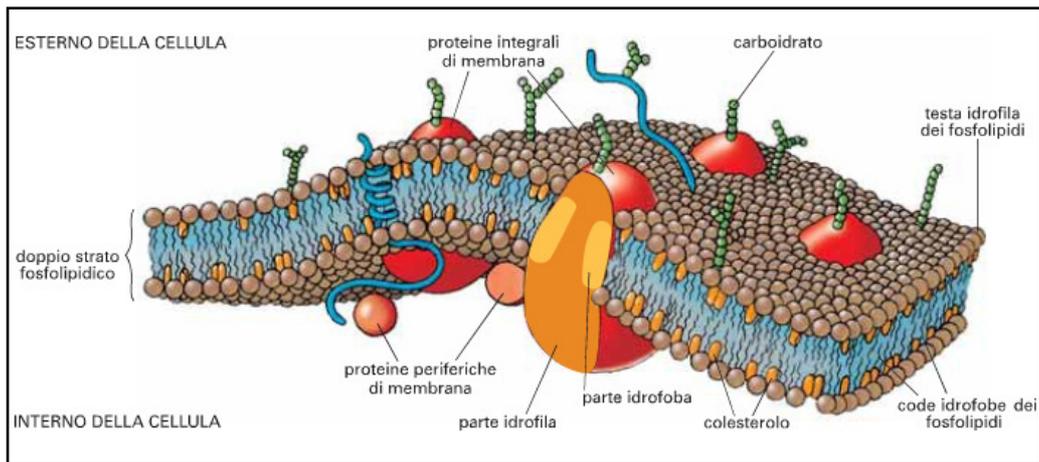


Figura 5. Rappresentazione schematica della struttura e della composizione lipidica e proteica della membrana plasmatica [Modificato da Simons and Ikonen, 1997].

2.3. Carboidrati di membrana

Molti lipidi e proteine del foglietto esterno sono legati covalentemente a zuccheri. I glicolipidi insieme alle glicoproteine, costituiscono il glicocalice, uno strato di carboidrati che riveste la porzione esterna della membrana. Il glicocalice svolge un importante ruolo di protezione della cellula da danni chimici e meccanici e, fungendo da recettore, è coinvolto in molte interazioni cellula-cellula (ad esempio l'adesione dei globuli bianchi alle pareti endoteliali dei vasi durante il processo infiammatorio) [Cooper and Hausman, 2009].

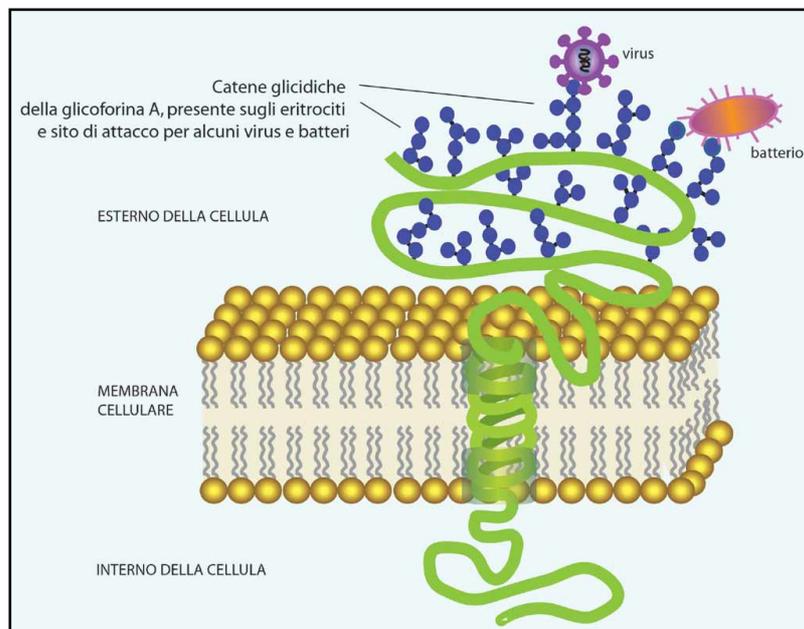


Figura 6. Rappresentazione schematica della localizzazione di una glicoproteina sulla membrana plasmatica di un eritrocita [Gagneux and Varki, 1999].

3. FLUIDITA' di MEMBRANA

L'ambiente acquoso che circonda le membrane cellulari impedisce ai lipidi, in particolare ai glicerofosfolipidi, di uscire dal doppio strato ma essi sono liberi di muoversi al suo interno e da un foglietto all'altro. Alcuni di questi movimenti, come la rotazione intorno al loro asse maggiore a causa degli urti termici e lo spostamento laterale, sono molto frequenti; altri, come il passaggio da un monostrato all'altro (movimento flip-flop), sono molto più rari.

La facilità con cui le molecole lipidiche di una membrana cellulare migrano nel piano del doppio strato è definita fluidità di membrana, proprietà che è alla base del modello a un mosaico fluido della struttura di membrana [Patel and Insel, 2009; Cooper and Hausman, 2009; Nicolson and Singer, 1972].

La fluidità di membrana ad una data temperatura dipende dalla composizione lipidica della membrana ed, in particolare, tanto più le code apolari sono fittamente e regolarmente disposte, tanto più il doppio strato è viscoso e poco fluido. La disposizione delle code idrocarburiche è condizionata da due caratteristiche: la loro lunghezza e il numero di doppi legami che contengono (in questo caso i FA si definiscono insaturi). Le code idrocarburiche sono costituite da 14-24 atomi di carbonio, più frequentemente 18-20; lunghezze inferiori riducono le interazioni tra le code apolari e aumentano la fluidità del doppio strato. Generalmente i fosfolipidi contengono un AG saturo, disposto in modo lineare, e un AG insaturo in cui ogni doppio legame determina una distorsione nell'ossatura carboniosa che limita i contatti con le altre code e rende quindi più fluida la membrana.

La fluidità di membrana è un'importantissima caratteristica cellulare: infatti permette la diffusione laterale e l'interazione reciproca delle proteine nel doppio strato fosfolipidico, la corretta dispersione e distribuzione di lipidi e proteine neosintetizzati in tutta la membrana e, infine, la fusione di membrane con la corretta redistribuzione delle loro componenti, indispensabile nel processo di divisione cellulare. È quindi necessario modulare la fluidità di membrana per far fronte a condizioni che potrebbero alterarla funzionalmente, come ad esempio variazioni di temperatura.

Nelle cellule animali la fluidità di membrana è regolata anche dalla presenza di CL, inserito nel doppio strato fosfolipidico in modo che il suo gruppo -OH si disponga vicino alle teste polari. La sua struttura rigida e corta riempie gli spazi presenti che si vengono a creare tra le code apolari dei fosfolipidi a causa delle distorsioni delle catene idrocarburiche insature, rendendo così il doppio strato meno fluido e permeabile. Nel caso di innalzamento della temperatura, l'energia termica delle molecole aumenta rendendo il doppio strato più fluido; la presenza di CL interferisce con i movimenti delle code apolari dei FL irrigidendo la membrana. In caso di abbassamento della temperatura, il CL ha l'effetto opposto: interferendo con le code apolari infatti previene il

congelamento mantenendo la fluidità di membrana [Vestergaard et al., 2010; Cooper and Hausman, 2009; Saini et al., 2004].

3.1.Lipid rafts

Sebbene il modello a mosaico fluido sia scientificamente accettato, osservazioni effettuate sin dagli anni '50 sembravano indicare che non tutti i lipidi e le proteine presenti nel doppio strato fosfolipidico avessero lo stesso grado di libertà di movimento. Erano state infatti individuate invaginazioni della membrana plasmatica chiamate *caveolae* e porzioni discrete di membrana (lipid rafts) non altrimenti definite se non come regioni arricchite in CL e GG che rappresentavano ancora per alcune proteine di membrana [Cooper and Hausman, 2009; Patel and Insel, 2009, Yamada, 1955; Palade, 1953]. Negli anni '80 ulteriori lavori hanno identificato questi domini di membrana in molti tipi cellulari e ne hanno correlato le alterazioni con numerose condizioni patologiche (distrofia muscolare, ischemia, etc..) [Patel and Insel, 2009; Abrahams et al., 1980; Oguchi and Tsukagoshi, 1980].

Ad oggi sempre più numerose evidenze sostengono la presenza di domini di membrana con composizione e funzioni specializzate. A causa delle difficoltà sperimentali nelle fasi isolamento, purificazione e distinzione, la loro definizione è ancora scientificamente dibattuta. Queste strutture sono insolubili a detergenti non ionici, come il TRITON X-100, a 4°C e possono quindi essere separate dalle altre regioni di membrana (sensibili ai detergenti) tramite centrifugazione. Una volta ottenuta la frazione arricchita in domini resistenti ai detergenti (DRM) risulta però notevolmente complesso riconoscerne i sottotipi, *caveolae* o lipid rafts, e ancor più separarli evitando contaminazioni. L'analisi delle proteine presenti nella frazione DRM può essere utile solo per avere informazioni qualitative: la marcata presenza della proteina caveolina identifica infatti le *caveolae*, mentre la proteina flotillina sembra essere arricchita nei lipid rafts [Cooper and Hausman, 2009; Patel and Insel, 2009; Dodelet-Devillers et al., 2009].

Recentemente la comunità scientifica accetta le seguenti definizioni:

- i lipid rafts sono microdomini di membrana eterogenei arricchiti in CL e sfingolipidi dalle dimensioni comprese tra i 10 e i 200nm. Sono anche noti come domini ordinati (liquid-ordered) della membrana a causa dei numerosi legami che instaurano tra loro le molecole che li costituiscono. Gli sfingolipidi interagiscono lateralmente tramite forze di van der Waals e tramite legami a idrogeno tra le sfingosine e gli zuccheri di molecole adiacenti, mentre la maggior parte dei FL possiede code apolari altamente saturate, capaci quindi di impacciarsi riducendo la possibilità di movimento laterale e favorendo legami con lipidi adiacenti. Le interazioni tra molecole vicine è inoltre promosso dalla massiccia presenza di CL. Funzionalmente, la presenza dei lipid rafts

consente un'ottimale compartimentalizzazione dei processi cellulari concentrando proteine e lipidi in un determinato micro-ambiente della membrana plasmatica e delle membrane intracellulari [Di Paolo and Kim, 2011; Rushworth and Hooper, 2010; Lingwood and Simmons, 2010; Patel and Insel, 2009; Wennekes et al., 2009; Dodelet-Devillers et al., 2009].

- le *caveolae* rappresentano una sottoclasse di lipid rafts e sono invaginazioni della membrana plasmatica delle dimensioni di 50-100nm. Al loro interno è arricchita la proteina caveolina, considerata un loro marker [Patel and Insel, 2009; Lajoie and Nabi, 2007; Chauhan, 2003].

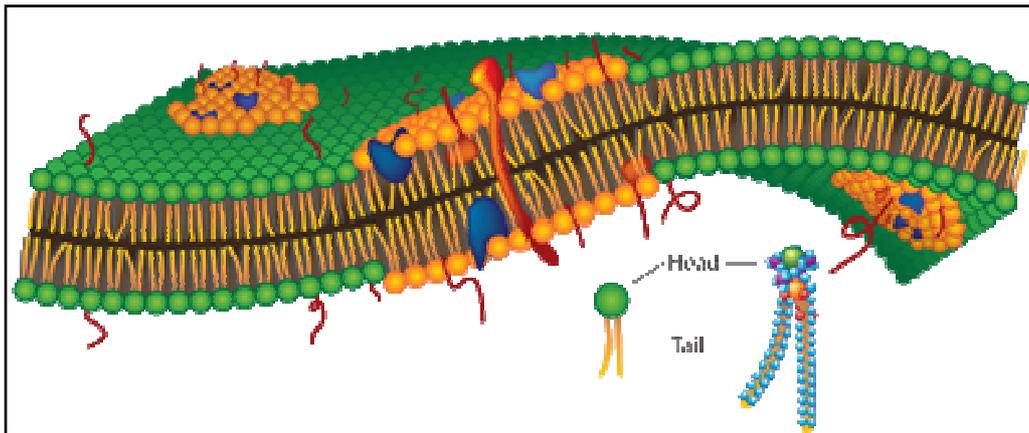


Figura 7. Rappresentazione schematica dell'organizzazione dei lipid rafts in membrana plasmatica [Los Alamos Science and Technology Magazine].

4. EVENTO IPOSSICO/ISCHEMICO

Con il termine ipossia si definisce una condizione in cui si verifica una riduzione dell'apporto di ossigeno (nel caso in cui l'ossigeno manchi completamente si parla di anossia) dovuta nella maggior parte dei casi all'incapacità del sistema cardio-respiratorio di soddisfare le richieste dell'organismo, risultando in una ridotta disponibilità di ossigeno a livello tissutale.

Il valore critico di pressione parziale dell'ossigeno, che definisce un tessuto come ipossico, è tessuto-specifico e dipende dalla richiesta di ossigeno, dal suo apporto e dalla capacità aerobica del tessuto. Nell'atmosfera la percentuale di ossigeno è del 21%; la quantità di ossigeno presente nei diversi tessuti è invece molto eterogenea: 14% a livello alveolare, 12% nel sangue arterioso, 5.3% nel sangue venoso e mediamente 3% nei tessuti. Nell'encefalo dei mammiferi, i livelli di ossigeno interstiziale sono molto variabili e compresi tra l'1% e il 5% [Sharp and Bernaudin, 2004].

Col termine ischemia si definisce la mancanza di apporto di sangue arterioso o una condizione di ostacolo al deflusso venoso in un tessuto, causata in genere da un difetto dei vasi sanguigni. Durante l'ischemia i tessuti non ricevono né ossigeno né metaboliti, tra cui il glucosio [Sharp and Bernaudin, 2004].

In mancanza, o ridotta disponibilità, di ossigeno la produzione cellulare di energia avviene prevalentemente attraverso il processo di glicolisi anaerobica; tuttavia l'esaurimento dei substrati energetici derivante dal loro mancato apporto in condizioni ischemiche inibisce questa via metabolica. Pertanto, il danno cellulare provocato dall'ischemia è più rapido e più grave di quello causato dall'ipossia e promuove generalmente meccanismi di morte cellulare [Hertz, 2008; Ratan et Al., 2007].

4.1. Ischemia cerebrale e BEE

Dato l'importante ruolo svolto dalla BEE nella regolazione e nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale, la perdita della sua funzionalità può rappresentare un evento cruciale nello sviluppo e nella progressione di diverse patologie che colpiscono il CNS.

Un evento ischemico costituisce un insulto per la BEE: causa, infatti, la rottura delle giunzioni strette tra cellula e cellula (tight junctions, TJ) a livello endoteliale, la perdita diffusa di sostanze attraverso la parete vasale necrotica, con conseguente aumento della permeabilità paracellulare, e compromette i meccanismi di autoregolazione del flusso ematico, determinando vasocostrizione ed ipoperfusione [Lin and Perez-Pinzon, 2013; Pluta and Ulamek, 2008].

Inoltre, lo stato infiammatorio che si genera in seguito a condizioni ischemiche, sembra partecipare al danno della BEE: l'induzione dell'enzima cicloossigenasi 2 (COX2) e la secrezione della

Metalloproteasi-9 contribuiscono infatti alla degradazione della membrana basale e alla compromissione dell'integrità di barriera [Yang and Rosenberg, 2011; Jablonski et al., 2011; Popescu et al., 2009; Pluta and Ulamek, 2008; Hawkins and Davis, 2005].

Jablonski e collaboratori (2011) hanno, inoltre, osservato che queste alterazioni morfologiche e funzionali della BEE persistono fino un anno dopo l'insulto nell'encefalo di ratti sottoposti ad ischemia e successiva riperfusione.

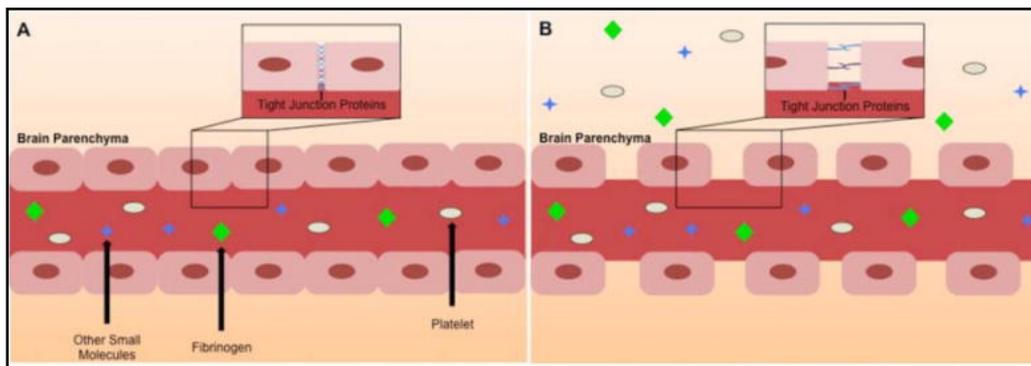


Figura 8. Struttura della BEE in condizioni fisiologiche, caratterizzata dalla compattezza del monostrato endoteliale per la presenza di giunzioni strette (A), sottoposta a condizioni ischemiche, in evidenza il danno a carico delle giunzioni strette e la presenza di spazi tra cellule adiacenti (B) [Modificato da Borlongan et al., 2012].

5. LIPIDI e ISCHEMIA CEREBRALE

Nonostante numerosi studi abbiano messo in evidenza la correlazione fisiopatologica tra i livelli plasmatici di lipidi e la suscettibilità a disfunzioni cerebrovascolari e al verificarsi di episodi ischemici [Skretteberg et al., 2013; van Holten et al., 2013; Benn, 2009; Gonzalez et al., 2008], sono state ancora poco investigate le variazioni lipidiche indotte in cellula dalle condizioni ischemiche, in particolare a livello del distretto vascolare cerebrale.

Negli anni '70, Wexler (1970) osservò, in ratti sottoposti ad ischemia cerebrale transiente mediante occlusione bilaterale della carotide, un drastico aumento dei valori plasmatici di trigliceridi, AG liberi, CL e glucosio, probabilmente dovuto alla mobilitazione dei grassi dal tessuto adiposo periferico verso il fegato. Le modalità con cui le variazioni plasmatiche dei livelli lipidici possano essere coinvolte nel tentativo di supplire alla richiesta energetica dell'encefalo non sono però state chiarite, nonostante sia noto che la perdita di funzionalità neuronale, derivante della deplezione delle riserve energetiche cellulari, risulta irreversibile quando viene compromessa l'integrità delle membrane cellulari.

L'incremento dei livelli plasmatici di lipidi correla con la loro globale riduzione osservata più recentemente nel distretto nervoso di ratti sottoposti ad occlusione dell'arteria cerebrale [Simao et al., 2013]. Le condizioni ischemiche, inoltre, promuovono una riduzione della fluidità di membrana, che può essere conseguenza sia della perossidazione lipidica nel *core* idrofobico della membrana [Phelan and Lange, 1991] sia di variazioni dei fisiologici rapporti tra FL e proteine di membrana [Ray et al., 1994]. In particolare è stato riportato che l'evento ischemico promuove l'attività dell'enzima fosfolipasi A2 (cPLA₂) che media l'idrolisi degli AG, in particolare l'acido arachidonico (AA), dai FL di membrana [Janfelt et al., 2012; Ramirez et al., 2003; Rao et al., 2000]. L'incremento dei livelli di AA in risposta a condizioni ischemiche, oltre a sostenere il processo infiammatorio, sembra alterare il funzionamento mitocondriale, favorendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [Schonfeld et al., 2011; Michiels et al., 2002; Nakano et al., 1990]. I ROS danneggiano primariamente le membrane cellulare ed promuovono l'ossidazione del *core* idrofobico nelle regioni ricche di AG poli-insaturi: la loro perossidazione, riducendo lo spazio tra code idrofobiche adiacenti, limita la loro libertà di movimento e contribuisce alla diminuzione della fluidità di membrana [Adibhatla et al., 2001; McLeod and Sevanian, 1997; Phelan and Lange, 1991].

In più, le condizioni ischemiche inducono l'attività dell'enzima sfingomielinasi, responsabile della conversione della sfingomielina (SM) in ceramide, una molecola che, partecipando al danno mitocondriale, promuove apoptosi [Adibhatla et al., 2001; Rao et al., 2000].

Nella corteccia cerebrale di ratti sottoposti a occlusione dell'arteria cerebrale, Whitehead e collaboratori (2011) hanno rilevato l'aumento dei livelli di GM2 e GM3, i precursori biosintetici del GM1, il GG maggiormente espresso nelle membrane neuronali. Poiché in modelli *in vivo* di ischemia sono stati osservati disturbi nei processi di sinaptogenesi e mielinogenesi nelle medesime aree in cui si riduce l'espressione dei GG [Ramirez et al., 2003], è stato proposto che l'incremento di GM3, sebbene derivi da un'alterazione del metabolismo del GM1, possa svolgere un ruolo protettivo nella regione infartuata [Kwak et al., 2005].

Variazioni dei livelli di CL sono state rilevate in studi condotti in cellule muscolari lisce dell'aorta di coniglio, nel filone di lavori che indagano i meccanismi alla base dell'aterosclerosi. Tsukitani e colleghi (1984) hanno infatti dimostrato un aumento delle quantità di colesterolo, sia in forma libera che esterificata (CE), in seguito a ipossia, quando le cellule sono incubate in presenza di siero di animali nutriti con dieta ipercolesterolemica. La presenza di elevati livelli di CL nell'ambiente extracellulare sembra essere indispensabile per questo aumento della quota di CE, dal momento che l'attività dell'enzima acil-CoA colesterolo aciltrasferasi (ACAT1), responsabile della sua esterificazione, è inibita in condizioni ischemiche [Smith et al., 1989].

Sebbene siano noti alcuni dei meccanismi tramite cui le condizioni ischemiche danneggiano la struttura e la funzionalità delle cellule endoteliali della BEE, l'attenzione si è focalizzata prevalentemente su proteine coinvolte nella degradazione della lamina basale o nell'induzione del conseguente stato infiammatorio [Zhou et al., 2012; Yang and Rosenberg, 2011; Jablonski et al., 2011; Popescu et al., 2009]. Al contrario, non sono state sinora analizzate eventuali variazioni dell'assetto lipidico di membrana nel distretto vascolare cerebrale, nonostante l'importanza dell'organizzazione lipidica e dei microdomini di membrana per la corretta funzionalità della BEE.

6. ALZHEIMER

Il morbo di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata dal deterioramento delle funzioni cognitive e mnemoniche del paziente, dalla sua progressiva incapacità di esplicitare normali attività quotidiane e da alterazioni comportamentali, tra cui la comparsa di uno stato di aggressività, ansia ed agitazione, oppure uno stato di depressione ed apatia [Mayeux and Stern, 2012; Zhang et al., 2011; Jalbert et al., 2008].

L'AD è la causa più frequente di demenza nei paesi occidentali. I dati epidemiologici indicano che negli Stati Uniti d'America circa 5.5 milioni di persone sono affette da AD e si stima che a livello mondiale i malati siano circa 24 milioni. L'incidenza dell'AD è proporzionale all'età della popolazione e ci si aspetta che nel 2040 possa raddoppiare, dal momento che l'età media della popolazione sta aumentando nei paesi industrializzati e in quelli in via di sviluppo [Mayeux and Stern, 2012; Jalbert et al., 2008].

Le caratteristiche neuropatologiche della malattia sono:

- presenza nell'encefalo di placche senili a livello extracellulare. Hanno un diametro fino a 200um e sono costituite da un *core* circondato da assoni distrofici, astrociti reattivi, cellule fagocitarie e proteine rilasciate dai neuroni stessi o derivanti da cellule danneggiate e in via di degenerazione delle aree circostanti. Il *core* è formato da diverse proteine aggregate fra loro, di cui la più abbondante è il peptide amiloide $A\beta_{42}$. L'accumulo di aggregati di $A\beta_{42}$, attivando la microglia, promuove il rilascio di citochine pro-infiammatorie e la formazione di composti tossici, tra cui i ROS e le specie reattive dell'azoto (RNS), che aggravano il danno neuronale già in atto [Di Paolo and Kim, 2011; Heneka et al., 2010; Jalbert et Al.,2008].
- presenza di grovigli neurofibrillari (neurofibrillary tangles, NTF) a livello intracellulare che alterano la struttura e la funzionalità del citoscheletro, in particolare dei microtubuli, che vengono degradati e persi causando perdita di funzionalità neuronale. L'accumulo di NTF è strettamente associato allo stato di iperfosforilazione della proteina Tau. In condizioni fisiologiche, la proteina Tau si associa ai microtubuli regolandone la stabilità e l'orientamento nei neuroni e promuovendo il trasporto assonale in senso anterogrado; nello stato iperfosforilato, invece, la proteina Tau perde questa sua capacità regolatoria e aggrega formando gli NTF [Di Paolo and Kim, 2011; Heneka et al., 2010; De Felice et Al., 2008].
- angiopatia congofilica, ovvero la deposizione extracellulare di $A\beta_{42}$ e $A\beta_{40}$ sulle pareti dei vasi sanguigni cerebrali, visualizzata tramite colorazione Congo Red [Sagare et al., 2012; Kalaria et al., 2012; Jaynes and Provias, 2011; Altman and Rutledge, 2010; Iadecola, 2004].
- presenza di tessuto necrotico dovuto a infarti cerebrali [Jalbert et Al., 2008].

- leucoaraiosi, ovvero la rarefazione della sostanza bianca, soprattutto nelle zone in prossimità dei ventricoli cerebrali [Jalbert et Al., 2008; Anderton, 2002].
- accumulo intraneuronale di proteine e lipidi perossidati (granuli lipidici) che possono essere rilevati tramite colorazione con il pigmento lipofuscina. Il loro accumulo indica un aberrante metabolismo lipidico e una ridotta capacità cellulare di espellere ed eliminare questi composti dannosi [Di Paolo and Kim, 2011].

6.1. APP: sintesi, maturazione e processamento

Il peptide $A\beta_{42}$ deriva dal processamento della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP), una glicoproteina transmembrana della via secretoria. APP è sintetizzata nel reticolo endoplasmatico (ER), passa poi nell'apparato di Golgi e dal trans-Golgi Network (TGN) è indirizzata alla membrana cellulare. In cellule in coltura solo il 10% di APP risiede in membrana plasmatica: il 70% circa delle forme mature di APP viene infatti rapidamente internalizzato negli endosomi e può successivamente arrivare ai lisosomi [Claeysen et al., 2012; Zhang et al., 2011; Vetrivel and Thinakaran., 2006].

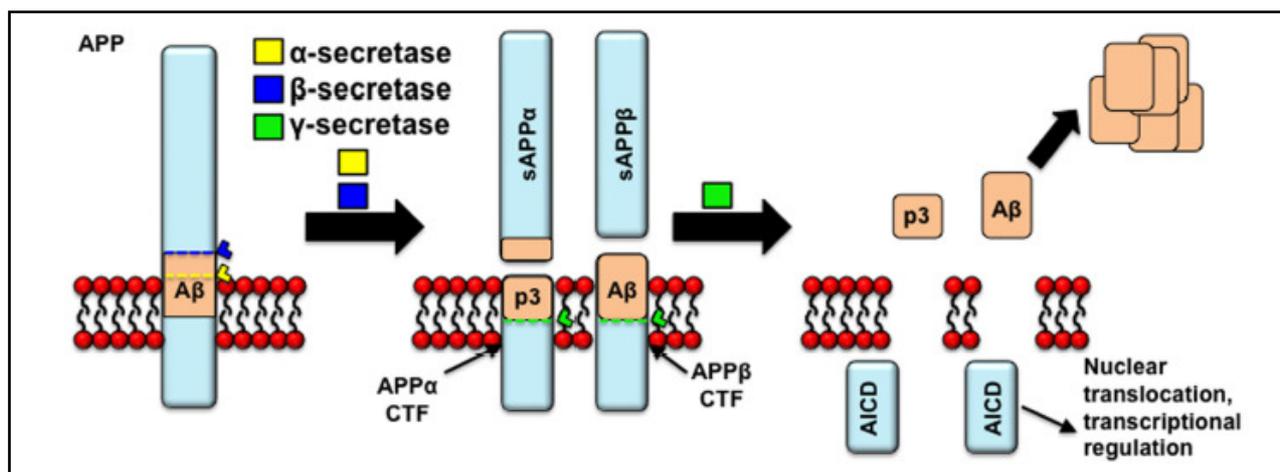


Figura 9. Processamento della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP) [Modificato da Claeysen et al., 2012].

In membrana, APP è riconosciuta da una famiglia di enzimi definiti secretasi, che lavorano in coppia, tagliando proteoliticamente legami aminoacidici di specifiche sequenze. Se il taglio proteolitico è mediato in successione dall'α-secretasi e dalla γ-secretasi il processamento di APP è definito non amiloidogenico, mentre il peptide $A\beta_{42}$ è prodotto (processamento amiloidogenico) quando in successione agiscono β e γ-secretasi. Il peptide $A\beta_{42}$, non essendo solubile, tende ad aggregare formando oligomeri e, nell'ambiente extracellulare, fibrille e placche senili [Claeysen et al., 2012; Zhang et al., 2011; Heneka et al., 2010; Stockley e O'Neill, 2008].

In condizioni fisiologiche, nell'encefalo, l'equilibrio tra l'attività dell' α e della β -secretasi è a favore dell' α -secretasi: sono quindi prodotte quantità di peptide $A\beta_{42}$ (circa il 10% di tutte le forme di $A\beta$) che non risultano nocive per il normale funzionamento delle reti nervose [Claeysen et al., 2012; Vetrivel and Thinakaran, 2006].

Con l'invecchiamento, per cause ancora da chiarire, questo equilibrio viene alterato e aumenta la frequenza del taglio amiloidogenico catalizzato dalla β -secretasi, che porta all'incapacità del sistema di metabolizzare il peptide $A\beta_{42}$ e favorisce la formazione patologica di aggregati e placche senili [Claeysen et al., 2012; Zhang et al., 2011; Stockley e O'Neill, 2008; Vetrivel and Thinakaran, 2006].

6.2.BACE1

BACE1 (β -site Amyloid precursor protein-Cleaving Enzyme) è la β -secretasi responsabile della produzione di $A\beta_{42}$ nel cervello [Sathya et al., 2012; Stockley and O'Neill, 2008].

BACE1 è una proteina transmembrana e il suo sito catalitico, contenente i due residui di aspartato (Asp) essenziali nella sua attività enzimatica, è esposto nell'ambiente extracellulare o nel lume degli organelli dove il pH acido (intorno a 5) risulta ottimale per la sua attività. La porzione C-terminale citosolica può essere modificata post-traduzionalmente o essere legata da altre proteine a scopo regolatorio [Sathya et al., 2012; Tamagno et al., 2012; Vetrivel et al., 2009; Stockley and O'Neill, 2008; Parsons and Austen, 2005]. La palmitoilazione (legame covalente di AG) su tre residui di cisteina ad esempio è necessaria per la dimerizzazione dell'enzima e per la sua localizzazione nei lipid rafts di membrana, dove viene ulteriormente stabilizzata interagendo con proteine che possiedono l'ancora GPI [Vetrivel et al., 2009]. Nei rafts BACE1 interagisce e taglia APP anche in membrana plasmatica nonostante il pH neutro non sia ottimale per l'attività catalitica della secretasi [Sathya et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Stockley and O'Neill, 2008]

La porzione C-terminale di BACE1 possiede, inoltre, un dominio Leu-Leu che, alterando la topografia della membrana, permette l'internalizzazione del complesso BACE1/APP e la formazione di un endosoma, dove avviene prevalentemente il taglio amiloidogenico di APP [Sathya et al., 2012; Stockley and O'Neill, 2008]. Dall'endosoma, BACE1 può tornare in membrana direttamente o dopo aver transitato per il TGN, oppure essere indirizzata al lisosoma, dove viene degradata [Koh et Al., 2005; Qing et Al., 2004; Zhou et Al., 2004].

Come detto precedentemente, il taglio di APP mediato da BACE1 avviene preferenzialmente negli endosomi, sia precoci che tardivi, ma può anche avvenire a livello del reticolo endoplasmatico (ER), nel TGN o sulla membrana cellulare; in tutti questi compartimenti è, infatti, espressa anche la γ -secretasi [Sathya et al., 2012; Stockley e O'Neill, 2008; Vetrivel and Thinakaran, 2006].

In accordo con gli elevati quantitativi di $A\beta_{42}$ presenti, è stato dimostrato un aumento dell'attività di BACE1 nei cervelli di individui affetti da AD rispetto a soggetti sani. L'analisi comparata dei suoi livelli di espressione, sia come trascritto sia come proteina, al contrario, non ha fornito risultati univoci. Alcuni studi non mostrano, infatti, significativi cambiamenti dei livelli di trascritto nei cervelli AD, mentre altri indicano un aumento dell'espressione della proteina anche se non comparabile con l'incremento di attività precedentemente descritto.

Queste osservazioni lasciano supporre che esistano dei fattori regolatori dell'attività di BACE1 non collegati alla sua espressione, quali ad esempio la localizzazione subcellulare e nei microdomini di membrana e la sua regolazione tramite modificazioni post-traduzionali [Stockley and O'Neill, 2008].

6.3. Danno cerebrovascolare e AD

L'AD è una malattia multifattoriale e numerosi fattori di rischio sia ambientali (età, sesso), sia genetici, (specifici polimorfismi in alcuni *loci* genici), sia legati alla storia clinica del paziente concorrono alla sua patogenesi [Mayeux et al., 2012; Chen et al., 2009; Bazan et al., 2002]. Studi epidemiologici indicano in particolare che i fattori di rischio per l'AD e per le malattie cardiovascolari sono in gran parte sovrapponibili: il diabete, l'ipertensione, l'obesità e l'ipercolesterolemia ad esempio sono condizioni che aumentano la probabilità di sviluppare entrambe le patologie [de la Torre, 2010; Jellinger, 2010; Kalaria, 2010; Knopman and Roberts, 2010].

Analisi *post mortem* in cervelli di pazienti affetti da AD dimostrano, nel 60-90% dei casi, la presenza di alterazioni patologiche della microvascolatura cerebrale (atrofia e impoverimento della rete capillare) caratteristiche delle malattie cerebrovascolari. Inoltre, a livello endoteliale si osservano numerose modificazioni tra cui l'aumento del numero di vacuoli, la perdita di mitocondri e di proteine delle TJ [Sagare et al., 2012; Kalaria et al., 2012; Kalaria, 2010].

Parallelamente è stata rilevata la presenza dei marcatori dell'AD nel 40% dei pazienti affetti da demenza vascolare [Kalaria, 2012; Allan et al., 2012; Lewis et al., 2006; Kalaria and Ballard, 1999]. Le alterazioni cerebrovascolari sembrano precedere i processi neurodegenerativi. Infatti, in pazienti con malattie vascolari si osservano depositi di $A\beta_{42}$ nel lume dei vasi cerebrali e studi in modelli animali hanno dimostrato la comparsa dei marcatori neuropatologici dell'AD in seguito a riduzioni del flusso ematico cerebrale [Knopman and Roberts, 2010; Koike et al., 2010]. Sebbene i meccanismi molecolari non siano ancora stati compresi appieno, è possibile supporre che diffuse modificazioni cerebrovascolari causino non solo la disfunzione/degenerazione della microvascolatura, ma anche la comparsa delle placche senili [Sagare et al., 2012; Zlokovic, 2011].

L'accumulo cerebrale di $A\beta_{42}$, sia a livello neuronale sia vascolare, dipenderebbe non solo dalla sua aumentata produzione, ma anche e in misura preponderante dall'incapacità di eliminarlo dall'encefalo o dal suo aumentato afflusso dalla periferia, come conseguenza della perdita di funzionalità della BEE [Bulbarelli et al., 2012; Jablonski et al., 2011; Eisele et al., 2010; Pluta and Ulamek, 2008; Zlokovic, 2005; Deane et al., 2004].

7. LIPIDI e AD

Sebbene gli studi volti alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'eziologia dell'AD si siano focalizzati prevalentemente sull'accumulo cerebrale di $A\beta_{42}$ e sullo stato di iperfosforilazione della proteina Tau, è importante sottolineare che i cervelli di pazienti AD sono caratterizzati anche da una anomala presenza di granuli lipidici, probabile indicazione di un metabolismo lipidico aberrante [Di Paolo and Kim, 2011].

Negli anni '90 fu stabilita una correlazione tra metabolismo lipidico e AD quando l'allele $\epsilon 4$ del gene che codifica per l'apolipoproteina E (ApoE) venne identificato come fattore di rischio genetico per questa malattia [Corder et al., 1993]. Gli individui con una o due copie dell'allele $\epsilon 4$ hanno una probabilità maggiore di 3 o 8 volte, rispettivamente, di sviluppare la malattia rispetto ai portatori degli alleli $\epsilon 2$ e $\epsilon 3$; inoltre l'età d'insorgenza di AD diminuisce in modo dipendente dal numero di alleli $\epsilon 4$ presenti (7-9 anni per allele) [Maulik et al., 2012; Slooter et al., 1998; Corder et al., 1993].

La proteina ApoE partecipa alla regolazione del metabolismo del CL nell'encefalo e dei trigliceridi nel resto del corpo: media, infatti, il trasporto di particelle lipoproteiche a livello di BEE attraverso recettori specifici, come il low-density Lipoprotein (LDL) Receptor related Protein 1 (LRP1) [Maulik et al., 2012; Bu, 2009]. Si ipotizza che non solo la capacità di ApoE di legare il peptide amiloide e di modularne l'aggregazione e l'eliminazione, ma anche il suo ruolo nella regolazione dei livelli cerebrali di CL partecipi alla patogenesi dell'AD [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Schweinzer et al., 2011; Yang et al., 2010; Vestergaard et al., 2010; Chauhan, 2003].

Recenti studi di analisi lipidomica comparativa in tessuti cerebrali ottenuti da pazienti AD e da individui controllo e in modelli murini dimostrano, infatti, la presenza di consistenti variazioni lipidiche nelle regioni maggiormente danneggiate dalla malattia [Chan et al., 2012].

La maggior parte, se non tutte, le classi di lipidi sembrano coinvolte nella patogenesi dell'AD: in primo luogo, infatti, i lipidi regolano la localizzazione e/o l'attività proteolitica delle proteine di membrana che hanno un ruolo importante in questa patologia (APP, BACE1 e i componenti della γ -secretasi). Inoltre, il peptide $A\beta_{42}$ esercita la sua attività tossica perturbando proprio la membrana plasmatica attraverso meccanismi sia diretti che indiretti, e, infine, i lipidi regolano la tendenza ad aggregare di $A\beta_{42}$ e probabilmente anche della proteina Tau [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Yang et al., 2010].

7.1. Glicerofosfolipidi e AD

La tossicità del peptide $A\beta_{42}$ dipende in larga misura dalla sua interazione con le membrane cellulari, che nel tempo causa la perdita della loro integrità e delle loro funzioni di trasduzione del

segnale, in particolare a livello sinaptico, portando al declino cognitivo caratteristico della malattia [Di paolo and Kim, 2011].

Sono state rilevate variazioni dei livelli di FL e dell'attività degli enzimi fosfolipasi nei cervelli di pazienti affetti da AD [Wallace, 1994; Stokes and Hawthorne, 1987] che precedono le alterazioni sinaptiche osservate [Di Paolo and Kim, 2011; Berman et al., 2008].

Studi *in vitro* hanno dimostrato che il fosfatidilinositolo bifosfato (generato dall'enzima fosfolipasi C) riduce l'attività della γ -secretasi [Osenkowski et al., 2008] e la sua espressione è inversamente proporzionale alla quantità di $A\beta_{42}$ rilasciato da fibroblasti in coltura [Landman et al., 2006].

Il danno cellulare indotto dal peptide $A\beta_{42}$ è mediato, inoltre, dal rilascio di AA dai FL ad opera dell'cPLA₂. L'AA viene infatti convertito in numerosi metaboliti, tra cui prostaglandine e leucotrieni, coinvolti in molti aspetti clinici dell'AD, quali lo stato infiammatorio, l'induzione della trasmissione glutammatergica e lo stress ossidativo [Sanchez-Mejia and Mucke, 2010; Sanchez-Mejia et al., 2008; Malaplate-Armand et al., 2006; Kriem et al., 2005].

Infine, l'incremento dell'attività dell'enzima fosfolipasi D₂, risultante nell'aumento di acido fosfatidico, altera le capacità mnemoniche e di potenziamento sinaptico a lungo termine anche se i meccanismi molecolari coinvolti non sono noti [Oliveira and Di Paolo, 2010; Oliveira et al., 2010].

Recentemente è stato ipotizzato che le placche senili e le fibrille di amiloide, considerate specie meno tossiche rispetto agli oligomeri di $A\beta_{42}$ [Shankar and Walsh, 2009; Roychaudhuri et al., 2009; Lesne et al., 2008], possano essere riconvertite ad oligomeri quando i parametri fisico-chimici dell'ambiente circostante vengono modificati da alterazioni del metabolismo lipidico. In condizioni fisiologiche, infatti, i FL di membrana svolgono un ruolo importante nel raggiungimento e mantenimento della struttura terziaria delle proteine, quindi una loro disfunzione potrebbe favorire la conversione delle fibrille in protofibrille [Elfrink et al., 2008; Martins et al., 2008]. Questa teoria potrebbe spiegare il motivo per cui la quantità di placche senili presenti nel cervello di un paziente non correla necessariamente con la gravità dei sintomi riscontrati [Vestergaard et al., 2010; Martins et al., 2008].

7.2.Sfingolipidi e AD

Sono state osservate alterazioni del metabolismo dei GG nei cervelli di pazienti affetti da AD: i loro livelli sono, infatti, ridotti nella maggior parte delle aree cerebrali lesionate, tra cui la corteccia cerebrale, l'ippocampo, i nuclei della base e la sostanza bianca frontale. Queste variazioni correlano con la perdita neuronale e la diminuzione dei solchi della corteccia cerebrale caratteristici della malattia [Svennerholm and Gottfries, 1994]. Inoltre, è stato osservato un aumento dei livelli di GM2 e GM3 in fibroblasti di pazienti AD rispetto a quelli di individui sani, che potrebbe dipendere

dall'aumentata attività dell'enzima β -galattosidasi, che idrolizza il GM1 in GM2, e dalla concomitante inibizione delle sialiltransferasi, che li risintetizzano [Pitto et al., 2005].

Al contrario, i cervelli di pazienti affetti da AD mostrano un incremento, anche se modesto, dei livelli di GG nei microdomini di membrana, indicando un possibile ruolo dei lipid rafts nei meccanismi patogenetici della malattia [Ariga et al., 2008; Molander-Melin et al., 2005].

È noto che i GG partecipano alla modulazione del processamento di APP, anche se i dati a disposizione non sono univoci: infatti, sebbene i livelli di GG, in particolare di GM1, correlino con le quantità di $A\beta_{42}$ prodotto e il rilasciato [Tamboli et al., 2005; Sawamura et al., 2004; Zha et al., 2004], la concomitante induzione del processamento non amiloidogenico indica che essi non agiscono in modo selettivo su BACE1 [Zha et al., 2004]. Inoltre, diversamente da quanto atteso, Sawamura e collaboratori (2004) è stato dimostrato che il blocco della sintesi degli sfingolipidi promuove la generazione del peptide, attivando la γ -secretasi.

Anche molecole glicosfingolipidiche più semplici, come la SM, agiscono da regolatori negativi dell'attività della γ -secretasi riducendo il rilascio di $A\beta_{42}$ [Grosen et al., 2010; Grimm et al., 2005].

È, inoltre, noto che il residuo di acido sialico dei GG è coinvolto nel cambiamento conformazionale del peptide $A\beta_{42}$ da una struttura relativamente disordinata ricca di eliche ad una altamente ordinata ricca in foglietti β , che favorisce il processo di fibrillogenesi. Sulla superficie di membrana, l'interazione tra due molecole di $A\beta_{42}$ è, infatti, favorita dal legame di una di esse con un GG, che promuove il cambio conformazionale e, agendo da stampo, la formazione di nuove fibrille [Ariga et al., 2008].

Nei cervelli di pazienti AD è presente il complesso GM1- $A\beta_{42}$ che è stato definito GA β [Yuyama and Yanagisawa, 2010; Ariga et al., 2008; Yanagisawa, 2007]. Il suo accumulo avviene negli organelli intracellulari coinvolti nella via endocitica, come gli endosomi precoci e tardivi, fornendo un'ulteriore conferma del coinvolgimento di questi compartimenti nei meccanismi patogenetici dell'AD [Kimura and Yanagisawa, 2007].

La formazione di GA β è proporzionale alla quantità di GM1 presente in membrana [Ariga et al., 2008; Yamamoto et al., 2004] ed è preferenzialmente coinvolto il peptide $A\beta_{42}$ (solo in misura minore il peptide $A\beta_{40}$ [Inaba et al., 2005]). I microdomini delle membrane neuronali, arricchiti in GM1, rappresentano, quindi, aree critiche per la generazione di GA β e, successivamente di oligomeri e fibrille amiloidi [Ariga et al., 2008; Yanagisawa, 2007].

7.3. Colesterolo e AD

Numerosi geni coinvolti nel metabolismo del CL sono stati associati alla patogenesi dell'AD, come ad esempio ApoJ (che codifica una proteina coinvolta nel suo trasporto), LRP1 (il suo principale recettore nel distretto cerebrale), l'enzima colesterol 24-idrossilasi (che ne media il catabolismo), il trasportatore ABCA1 (che ne media l'efflusso) e l'enzima ACAT1 (responsabile della sua esterificazione) [Maulik et al., 2012].

Studi epidemiologici hanno, inoltre, suggerito una correlazione tra alti livelli di CL nel plasma e un elevato rischio di sviluppare AD, sulla base dell'associazione tra la deposizione di placche senili e gli elevati livelli di LDL riscontrata nel plasma di pazienti affetti da AD [Maulik et al., 2012; Mayeux and Stern, 2012]. In più, dati ottenuti in animali sottoposti a dieta ipercolesterolemica e in modelli cellulari *in vitro* hanno fornito evidenze biochimiche che supportano uno stretto legame tra i livelli di CL nel plasma e la produzione e deposizione del peptide A β ₄₂ [Reiss and Voloshyna, 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Martin et al., 2010].

Poiché i livelli di CL presenti nell'encefalo ed in periferia non sono interscambiabili, è stato proposto che gli effetti di una dieta ipercolesterolemica possano essere mediati proprio dalla microvascolatura cerebrale che connette i due distretti, oltre che dalle cellule gliali o neuronali [Maulik et al., 2012; Vestergaard et al., 2010; Bjorkhem et al., 2004].

7.3.1. Colesterolo e processamento di APP

È noto che elevati livelli cellulari di CL promuovono un aumento della produzione di A β ₄₂ e una riduzione del processamento non amiloidogenico e, parallelamente, trattamenti che impoveriscono le membrane di CL (come la metil- β -ciclodestrina, M β CD) o che ne diminuiscono i livelli (come gli inibitori dell'enzima chiave della sua biosintesi) promuovono il taglio proteolitico dell' α -secretasi, limitando quindi la produzione di A β ₄₂ [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Schweinzer et al., 2011; Vestergaard et al., 2010].

La localizzazione in membrana delle secretasi è differente: l' α -secretasi si trova prevalentemente nelle regioni non rafts di membrana, mentre una quota di BACE1 e i componenti della γ -secretasi sono generalmente associati ai microdomini di membrana. APP localizza sia nelle regioni rafts che non rafts di membrana [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Yang and Rosenberg, 2010].

È, quindi, scientificamente accettato che variazioni del contenuto cellulare di CL, e della sua quantità in membrana, modulino l'integrità e la funzionalità dei lipid rafts e modifichino la localizzazione di APP e delle secretasi, rappresentando un fattore cruciale nella regolazione dell'equilibrio tra processamento amiloidogenico e non amiloidogenico [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Marquer et al., 2011; Grosgen et al., 2010].

Secondo le ipotesi più accreditate, elevati livelli di CL, aumentando il numero di lipid rafts in membrana, promuoverebbero la colocalizzazione di APP, BACE1 e γ -secretasi o l'attività di queste ultime, risultando nella generazione del peptide $A\beta_{42}$ [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Marquer et al., 2011; Grosgen et al., 2010]. Al contrario, una riduzione dei livelli di CL, alterando l'integrità dei microdomini di membrana, favorirebbe l'attività dell' α -secretasi [Kojro et al., 2001]. I dati ottenuti non sono però univoci. Studi *post mortem* condotti sull'ippocampo di individui sani hanno, infatti, dimostrato una minima colocalizzazione di BACE1 e APP nei microdomini di membrana, che risulta invece ben più marcata nei soggetti affetti da AD, ma, diversamente da quanto atteso, nei malati è stata osservata una riduzione di CL, anche se modesta [Abad-Rodriguez et al., 2004; Ledesma et al., 2003].

E' probabile che l'entità delle variazioni di CL possa incidere sulle modulazioni del processamento di APP. In neuroni ippocampali, infatti, una modesta diminuzione di CL (< 25%) promuove la produzione di $A\beta_{42}$, mentre una variazione maggiore del 35% causa una drastica riduzione dei livelli del peptide [Abad-Rodriguez et al., 2004]. Secondo gli autori una lieve variazione di CL potrebbe favorire la dissociazione di BACE1 dai rafts promuovendo la sua interazione con APP e quindi il processamento amiloidogenico [Maulik et al., 2012; Abad-Rodriguez et al., 2004].

Oltre al suo ruolo nella modulazione della fluidità di membrana, è stato suggerito che alterazioni del trasporto del CL e, quindi, il suo accumulo nei compartimenti intracellulari possano contribuire alla regolazione del processamento di APP. In particolare l'inibizione del suo trasporto dalle vescicole endocitiche verso il RE ridurrebbe l'internalizzazione di APP dalla superficie, inibendo la produzione di $A\beta_{42}$, mentre l'accumulo di CL negli endosomi tardivi e nei lisosomi favorirebbe la generazione del peptide [Kodam et al., 2010; Jin et al., 2004]. Inoltre, l'aumentato efflusso di CL mediato dal trasportatore ABCA1 inibisce il taglio proteolitico di APP da parte di BACE1 e della γ -secretasi [Koldamova et al., 2005].

Infine, è stato osservato che anche variazioni del rapporto CL/CE sembrano regolare il processamento di APP: infatti, l'inibizione dell'enzima ACAT1, responsabile dell'esterificazione del colesterolo, contribuisce a determinare una riduzione dei livelli di $A\beta_{42}$ [Di Paolo and Kim, 2011; Grosgen et al., 2010; Puglielli et al., 2001].

SCOPO DEL LAVORO

La barriera ematoencefalica (BEE) costituisce l'interfaccia tra la circolazione sanguigna ed il sistema nervoso centrale (SNC) e, mantenendo l'omeostasi cerebrale entro ristretti limiti fisiologici, ne garantisce il corretto funzionamento. In particolare, la specifica organizzazione morfologica e strutturale della BEE, caratterizzata a livello endoteliale da un elevato numero di giunzioni strette (tight junctions, TJ) e dalla presenza di specifici trasportatori di membrana, correla con il suo ruolo di elemento chiave nella regolazione dei trasporti da e verso il SNC [Enciu et al., 2013; Lakhan et al., 2013; Abbott and Friedman, 2012; Wolburg et al., 2009; Hawkins and Davis, 2005; Ballabh et al., 2004]. Alla regolazione della permeabilità della BEE partecipano inoltre i microdomini di membrana (lipid rafts), porzioni eterogenee arricchite in colesterolo e sfingolipidi le cui dimensioni sono comprese tra 10 e 200nm [Di Paolo and Kim, 2011; Rushworth and Hooper, 2010; Lingwood and Simmons, 2010; Patel and Insel, 2009; Wolburg et al., 2009; Dodelet-Devillers et al., 2009; McCaffrey et al., 2007].

Considerando l'importanza del ruolo della BEE nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale, danni morfologici e funzionali a carico di questo distretto possono risultare cruciali nello sviluppo e nella progressione di diverse patologie del SNC [Sagare et al., 2012; Grinberg et al., 2012; Jaynes and Provias, 2011].

L'ischemia cerebrale rappresenta, ad esempio, una delle principali cause di danno funzionale alla BEE, provocando aumentata permeabilità paracellulare e perdita diffusa di materiale attraverso la parete vasale necrotica [Lakhan et al., 2013; Jablonski et al., 2011; An and Xue, 2009; Pluta and Ulamek, 2008; Koto et al., 2007]. In aggiunta, l'evento ischemico compromette i meccanismi di autoregolazione del flusso ematico, determinando vasocostrizione ed ipoperfusione [Lin and Perez-Pinzon, 2013; Pluta and Ulamek, 2008].

La riduzione del flusso ematico a livello cerebrale derivante da eventi ischemici ricorrenti aumenta, inoltre, il rischio di insorgenza della malattia di Alzheimer (AD) [Kalaria et al., 2012; Sagare et al., 2012; Yang and Rosenberg, 2011; Jaynes and Provias, 2011; Jablonski et al., 2011] ed è stato dimostrato in modelli neuronali che alcuni dei meccanismi molecolari attivati sono associati al processamento amiloidogenico della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP) [Guglielmotto et al., 2009; Zhang et al., 2007]. Recentemente l'aumentata produzione di peptide amiloide ($A\beta_{42}$) indotta da condizioni ischemiche è stata riportata anche in un modello *in vitro* di BEE [Bulbarelli et al., 2012].

L'ischemia cerebrale promuove, quindi, significative alterazioni sia delle proprietà della BEE sia a livello di fisiologico processamento di APP ed è noto che la composizione lipidica di membrana

partecipa alla modulazione di entrambi questi eventi [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Verstergaard et al., 2010; Wennekes et al., 2009]. Ciò nonostante è stato finora poco studiato l'effetto delle condizioni ischemiche sulla composizione lipidica di membrana nel distretto vascolare cerebrale.

Lo scopo del presente progetto è stato quello di studiare in cellule di endotelio cerebrale le variazioni delle principali classi di lipidi di membrana che, in risposta a condizioni ischemiche, potrebbero correlare funzionalmente con la produzione di elevati livelli di $A\beta_{42}$ [Bulbarelli et al., 2012].

I risultati di questo studio potrebbero indicare che l'assetto lipidico di membrana dell'endotelio cerebrale svolge un ruolo cruciale nella risposta cellulare a condizioni ischemiche, fornendo nuovi dettagli molecolari sulle alterazioni fisiopatologiche che portano allo squilibrio nel processamento di APP in senso amiloidogenico.

Come modello *in vitro* di BEE sono state utilizzate cellule RBE4 (linea di cellule endoteliali del microcircolo cerebrale di ratto) e le condizioni ischemiche sono state mimate *in vitro* mediante deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD). Le analisi sono state condotte, come precedentemente descritto [Bulbarelli et al., 2012], dopo 1 e 24 ore dal ripristino della normossia e normoglicemia e sono stati valutati i quantitativi di fosfolipidi (FL), gangliosidi (GG) e colesterolo (CL) nelle membrane delle cellule RBE4. È stato, inoltre, investigato l'effetto delle eventuali modificazioni lipidiche rilevate sulla fluidità di membrana, l'attività della β -secretasi, i livelli di espressione delle proteine associate al processamento amiloidogenico (APP e BACE1) e la loro localizzazione nelle differenti porzioni di membrana.

I risultati ottenuti in questo studio potrebbero fornire utili indicazioni per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici nella prevenzione e cura del morbo di Alzheimer, sostenendo, inoltre, l'importanza del contributo di cellule della BEE nelle fasi precoci di insorgenza di questa malattia.

MATERIALI

- Linea cellulare RBE4 (Rat Brain Endothelial Cells);
- Soluzioni per coltura cellulare RBE4: Euroclone (Milano);
- Reagenti in polvere con il massimo grado di purezza: Sigma Chemical Co (Milano);
- Solventi per TLC: VWR International PBI (Milano);
- Bombola contenente la miscela gassosa N₂ 95% CO₂ 5%: Sapiro (Caponago);
- Kit per il dosaggio dell'attività di BACE1: BioVision Incorporated (Milpitas, CA, USA);
- Standard per proteine: Novex Shasp Pre-Stained (Invitrogen, Milano);
- Bis-Acrlammide 30%: Sigma Chemical Co (Milano);
- TEMED: Sigma Chemical Co (Milano);
- Anticorpo anti-cPLA₂: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA);
- Anticorpo anti-COX2: Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA);
- Anticorpo anti-BACE1: Abcam (UK);
- Anticorpo anti-APP: Invitrogen Corporation (Milano);
- Anticorpo anti-CD81: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA);
- Anticorpo anti-Na⁺/K⁺ ATPasi: Millipore (Temecula, CA, USA);
- Anticorpo coniugato all'HRP: Pierce (Rockford, IL, USA) e Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA);
- ECL SuperSignal detection kit: Pierce (Rockford, IL, USA);
- Soluzioni e kit di biologia molecolare: Invitrogen Corporation (Milano).

APPARECCHIATURE

- Centrifuga per eppendorf 5415 R, rotore F45-24-11;
- Centrifuga per eppendorf MiniSpin Plus, rotore F45-12-11;
- Centrifuga Jouan BR4, rotore S40;
- Spettrofotometro Jasco V-530;
- Densitometro Biorad GS-710;
- Fluorimetro Cary Eclipse, Varian;
- Thermobloc Bibby Scientific Italia;
- Apparecchiatura per elettroforesi, Biorad;
- Apparecchiatura per trasferimento su nitrocellulosa, Hoefer;
- ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare;
- Microplate reader, Model 550, Biorad;
- Victor3 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer (Boston, MA, USA);
- Sonicatore Branson 2510;
- SpeedVac, Concentrator per eppendorf 5301, rotore F45-48-11;
- Incubatore, Seneco.

METODI

8. Linea cellulare RBE4

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ Soluzione di collagene

Collagene di tipo I (coda di ratto) 50ug/mL

Acido acetico 0.02M

❖ Tampone fosfato (PBS) 1X

❖ Terreno completo

Alpha-MEM 44%

Ham's F10 NUTRIENT 44%

L-Glutammina 2mM

Penicillina (100U/mL)/Streptomicina (100U/mL)

Siero fetale bovino (FBS) 10%

Geneticina 300ug/mL

PREPARAZIONE delle PIASTRE: RIVESTIMENTO con COLLAGENE

Le cellule RBE4 per aderire e crescere in condizioni ottimali necessitano di un substrato pretrattato con collagene. La soluzione di collagene riversata sulle piastre viene lasciata un'ora a temperatura ambiente (RT) schermata dalla luce e successivamente le piastre vengono lavate con soluzione salina tamponata (PBS), lasciate asciugare semiaperte per 30 minuti, utilizzate immediatamente o conservate a 4°C.

MANTENIMENTO IN COLTURA

Le cellule RBE4 a confluenza sono separate mediante tripsinizzazione e centrifugate a 125xg per 3 minuti. In seguito a risospensione in terreno, si effettua una diluizione 1:10 per avere le cellule confluenti in tre giorni.

9. Deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD)

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ BSS (Buffered Saline Solution)

NaCl 117mM

KCl 5.5mM

CaCl₂ 1.8mM

MgCl₂ 1mM

HEPES 20mM

NaHCO₃ 26mM

NaH₂PO₄ 1mM

pH 7.4

❖ SOLUZIONE di RIPRISTINO

Terreno completo

FBS 10% finale

Glucosio 5mM finale

❖ PBS addizionato di inibitori delle proteasi

NaCl 0.137M

KCl 2.7mM

Na₂HPO₄ 8.1mM

KH₂ PO₄ 1.5mM

Inibitori proteasi 1X

PROTOCOLLO

Le cellule RBE4 sono piastrate alla densità di 10000 cell/cm² e sottoposte a deprivazione di ossigeno e glucosio quando raggiungono l'80% di confluenza. Il terreno di coltura viene sostituito con la soluzione BSS e le piastre vengono inserite nella cameretta per ipossia, in cui viene insufflata la miscela gassosa N₂ 95% CO₂ 5%, per 10 minuti, un tempo sufficiente per sostituire l'aria presente con la miscela gassosa priva di ossigeno. Successivamente la cameretta, chiusa ermeticamente, viene posta nell'incubatore a 37°C per 3 ore. Al termine del trattamento le cellule vengono riportate in condizioni normossiche e addizionate della soluzione di ripristino.

10. Saggio di vitalità cellulare (MTT)

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ SOLUZIONE 1

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 5mg/mL

PBS 1X sterile

❖ SOLUZIONE 2

SOLUZIONE 1 diluita 1:10 in DMEM senza rosso fenolo.

PROTOCOLLO

Dopo 1 e 24 ore di ripristino post-OGD, si elimina il terreno dalle piastre, si effettua un lavaggio in PBS 1X e le cellule vengono incubate in SOLUZIONE 2 per 1 ora e 30 minuti a 37°C. In seguito si solubilizzano le cellule con etanolo assoluto e procede con la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda (λ) di 560nm. La percentuale di vitalità è calcolata con la seguente formula:

$$(\text{OD } 560\text{nm})_{\text{trattato}} / (\text{OD } 560\text{nm})_{\text{CTRL}} * 100.$$

11. Frazionamento cellulare ed estrazione dei microsomi di membrana

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ PBS addizionato di inibitori delle proteasi

❖ Soluzione ipotonica

Tris-HCl pH 7.4 1mM

Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) pH 7.4 1mM

KCl 15mM

NaCl 30mM

Inibitori proteasi 1X

❖ Soluzione isotonica 2X

Saccarosio 0.5M

Tris-HCl pH 7.4 2mM

EDTA pH 7.4 2mM

Inibitori proteasi 2X

❖ TBS 1X pH 7.6

Tris 20mM

NaCl 137mM

PROTOCOLLO

Dopo 1 o 24 ore di ripristino post-OGD delle condizioni normossiche e normoglicidiche, le cellule vengono raccolte meccanicamente in PBS addizionato con gli inibitori delle proteasi e centrifugate a 125xg per 5 minuti a 4°C. Il pellet cellulare viene risospeso in soluzione ipotonica e lasciato 5 minuti a 4°C. Le cellule vengono lisate meccanicamente mediante l'utilizzo di una siringa da insulina valutando lo stato di rottura delle membrane cellulari al microscopio ottico. Si aggiunge un pari volume di soluzione isotonica 2X e, dopo aver prelevato un'aliquota di omogenato totale, si centrifuga il campione a 800xg 12 minuti a 4°C per ottenere il pellet arricchito in nuclei e frammenti cellulari e il surnatante costituito da tutte le altre componenti cellulari (PNS). Il PNS viene centrifugato a 100000xg per 60 minuti a 4°C. Si ottiene quindi un pellet arricchito in microsomi di membrana (MEF) e un surnatante costituito dalla componente citosolica cellulare, che viene trasferito in un'altra provetta; il pellet microsomiale è risospeso in TBS 1X, agitato e sonicato.

12. Separazione frazioni di membrana TRITON X-100 solubili (TS) e TRITON X-100 insolubili (TI)

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ **MBST**

MES 25mM

NaCl 30mM

TRITON X-100 1%

Inibitori proteasi 1X

PMSF 1mM

❖ **TBST**

Tris-HCl pH 8 10mM

NaCl 150mM

TRITON X-100 1%

Inibitori proteasi 1X

PMSF 1mM

PROTOCOLLO

Le MEF sono risospese in MBST mediante passaggi in siringa da insulina e lasciate 30 minuti a 4°C. Dopo aver prelevato un'aliquota per le successive analisi, i campioni vengono centrifugati a 100000xg 60 minuti a 4°C [protocollo modificato da Donati et al., 2008]. Il pellet ottenuto rappresenta la frazione TI delle membrane, mentre il surnatante la frazione TS. Il pellet viene risospeso in un ugual volume di TBST.

13. Estrazione lipidi

SOLUZIONI UTILIZZATE:

- ❖ **PBS addizionato di inibitori delle proteasi**

- ❖ **Tetraidrofurano (THF): acqua (H₂O) 4:1 (v:v)**

- ❖ **Dietiletere**

- ❖ **Idrossido di sodio (NaOH) 0.1N in metanolo**

- ❖ **Acido cloridrico (HCl) 1N in metanolo**

PROTOCOLLO

Ai campioni si aggiunge THF: H₂O 4:1 (v:v) e si centrifugano a 16100xg per 12 minuti a 4°C. Per le MEF e le frazioni TS e TI risospese in soluzione acquosa si aggiunge THF in rapporto 4:1 (v:v). Il pellet ottenuto è costituito dalle componenti cellulari idrofiliche (acidi nucleici e proteine) e il surnatante rappresenta l'estratto lipidico totale (ELT), che viene recuperato e trasferito in una nuova provetta. Il pellet proteico viene nuovamente risospeso in THF:H₂O 4:1 (v:v) e centrifugato a 16100xg per 12 minuti a 4°C per 3 volte.

Il pellet proteico viene lasciato asciugare a RT, mentre all'ELT viene aggiunto dietiletere in quantità pari al 30% del suo volume e centrifugato a 16100xg per 7 minuti a 4°C, ottenendo la separazione della fase organica (FO), contenente FL e colesterolo, e della fase acquosa (FA) contenente i GG. La FA (più pesante) viene recuperata e trasferita in una nuova provetta; alla FO si aggiunge un volume di acqua pari al 10% del volume iniziale di ELT e si centrifuga a 16100xg per 7 minuti a 4°C per 2 volte. Sia la FA che la FO vengono poste sotto flusso di azoto per promuovere un'efficace evaporazione dei solventi. Eliminata la componente etere, la FA viene liofilizzata e sottoposta a metanolisi alcalina per eliminare eventuali FL presenti, aggiungendo NaOH 0.1N in metanolo e incubando 2 ore a 37°C. La reazione viene bloccata con HCl 1N in metanolo, addizionato a 4°C.

I campioni vengono portati a secco, risospesi in acqua e sottoposti a dialisi (membrana con cut-off: 12000-14000Da) per 72 ore a 4°C. Al termine della dialisi le FA dei campioni sono liofilizzate.

14. Valutazione della fluidità di membrana

SOLUZIONI UTILIZZATE:

- ❖ **PBS addizionato di inibitori delle proteasi**
- ❖ **Tampone fosfato di potassio pH 7.2 1mM**
K₂HPO₄ 1mM
KH₂PO₄ 1mM

- ❖ **Soluzione A**
Saccarosio 250mM
Tampone fosfato di potassio pH 7.2 1mM
EDTA 0.1mM
Inibitori proteasi 1X

- ❖ **Soluzione di DPH**
DPH 2uM in THF

PROTOCOLLO

Sulle MEF di ciascun campione si effettua il dosaggio del fosforo fosfolipidico (per il protocollo paragrafo 18) e si preleva un volume pari a 200nmol (6200ng) di fosforo. Si aggiunge la soluzione di DPH (1nmol DPH: 100nmol di fosforo inorganico) e si incubano i campioni in agitazione 45 minuti a 37°C schermati dalla luce. Infine si procede con la lettura al fluorimetro (λ_{ex} di 360nm e λ_{em} di 430nm) polarizzando la radiazione di eccitazione e leggendo le intensità di emissione nel seguente ordine:

- ✓ Radiazione di eccitazione verticale e radiazione di emissione verticale (VV)
- ✓ Radiazione di eccitazione verticale e radiazione di emissione orizzontale (VH)
- ✓ Radiazione di eccitazione orizzontale e radiazione di emissione orizzontale (HH)
- ✓ Radiazione di eccitazione orizzontale e radiazione di emissione verticale (HV)

L'anisotropia di fluorescenza (r) è calcolata mediante la seguente formula:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

Il prodotto delle intensità VV e HH rappresenta l'intensità parallela indicata nella formula (I_{\parallel}), mentre il prodotto delle intensità VH e HV l'intensità perpendicolare (I_{\perp}) [Grebowski et al., 2013; Peng et al., 2012; Schroeder et al., 1994; Karnovsky et al., 1982].

15. Dosaggio proteico (BCA)

SOLUZIONI UTILIZZATE

❖ Soluzione A

Na₂CO₃

NaHCO₃

BCA detection reagent

C₄H₄KNaO₆

❖ Soluzione B

CuSO₄ 4%

❖ NaOH 0.1N

PROTOCOLLO

Il pellet proteico ottenuto in seguito ad estrazione dei lipidi è risospeso in NaOH 1N e lasciato 16 ore RT. A ciascun campione si aggiunge la Soluzione B diluita 1:50 nella Soluzione A, e si incubano a 37°C per 30 minuti. La lettura allo spettrofotometro viene effettuata alla lunghezza d'onda di 540nm. Dall'equazione della retta di taratura ottenuta dai valori di assorbanza degli standards si determina la quantità di proteine totali presente nei campioni.

16. Cromatografia su strato sottile (TLC)

SOLUZIONI UTILIZZATE:

- ❖ **Cloroformio: metanolo in rapporto 2:1 (v:v)**

- ❖ **Solvente di corsa dei GG**
Cloroformio: metanolo: cloruro di calcio 0.2% (CaCl₂) 50:42:11 (v:v:v)

- ❖ **Solvente di corsa dei FL**
Cloroformio: metanolo: acido acetico: acqua 60:45:2 (v:v:v)

- ❖ **Solvente di corsa del CL**
Esano: dietilere: acido acetico 20:35:1 (v:v:v)

- ❖ **Solventi di corsa per la separazione di CL e CE**
Etilacetato: benzene 1:5 (v:v)
Eptano: benzene 97: 3 (v:v)

- ❖ **Reattivo di Ehrlich**
4-dimetilammino-benzaldeide 40mM
Etanolo 17.36M
HCl 2.03M

- ❖ **Reattivo a base di anisaldeide**
Acido acetico: acido solforico (97%): 4-metossibenzaldeide 100:2:1 (v:v:v)

- ❖ **Reattivo di Liebermann-Burchard**
Anidride acetica: acido solforico (97%): etanolo 5: 5: 50 (v:v:v)

- ❖ **Vapori di iodio**

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Dopo essere state liofilizzate o portate a secco, FA e FO dei diversi campioni vengono risospese in cloroformio: metanolo 2:1 (v:v) in un volume opportuno per la semina su lastra. Per l'analisi dei GG viene seminato un volume di FA pari a 300ug di proteine microsomiali; per FL e GG un

volume di FO pari a 40ug e 25ug di proteine microsomiali, rispettivamente. Per la separazione di CL e CE si semina un volume di FO pari a 75ug di proteine totali. Le bande ottenute dalla separazione dei campioni sono state identificate mediante la co-migrazione di standard lipidici caricati sulla medesima lastra. Al termine della corsa cromatografica, la lastra viene fatta asciugare.

RIVELAZIONE BANDE su TLC

Per le diverse classi di lipidi vengono effettuate diverse colorazioni:

- il reattivo di Ehrlich, specifico per i residui di acido sialico, viene utilizzato per rilevare le bande dei GG. La lastra viene nebulizzata con questo reattivo e lasciata 15 minuti a 180°C.
- Il reattivo a base di anisaldeide si lega ai composti ciclici e ai doppi legami e viene utilizzato per rivelare le bande di CL. La lastra viene immersa nel reattivo, lasciata asciugare e incubata 5 minuti a 180°C.
- Il reattivo di Liebermann-Burchard, adatto per la rivelazione di steroli e steroidi, è stato utilizzato per visualizzare le bande di CL e CE. La lastra viene immersa nel reattivo, lasciata asciugare e mantenuta a 110°C per 10 minuti.
- I vapori di iodio vengono utilizzati per rivelare le bande dei FL in quanto legano l'azoto e i gruppi OH, costituendo una colorazione aspecifica e temporanea. La lastra viene posta in un contenitore saturo di vapori di iodio fino alla rivelazione delle bande.

Le bande rese visibili dal reattivo di Ehrlich, dal reattivo a base di anisaldeide o con i vapori di iodio vengono acquisite densitometricamente (densitometro Biorad GS-710); la lastra rivelata mediante reattivo di Liebermann-Burchard viene posta sotto raggi UV ottenendo un segnale fluorescente rilevato tramite ImageQuant LAS 4000.

17. Dosaggio dell'acido sialico (metodo di Svennerholm)

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ Reattivo al resorcinolo

Resorcina

CuSO₄ 0.1M

HCl

❖ Solvente estraente

Acetato di butile: n-butanolo 85:15 (v:v)

PROTOCOLLO

La quantità di acido sialico presente nella FA dei campioni è stata determinata tramite dosaggio secondo il metodo di Svennerholm [protocollo modificato da Svennerholm, 1957].

La FA di ciascun campione viene portata a secco sotto flusso di azoto e risospesa in acqua. Si aggiunge un ugual volume di reattivo al resorcinolo e si lascia a 100°C per 15 minuti. I campioni vengono messi a 4°C, si aggiunge il solvente estraente e si centrifugano a 2300xg per 5 minuti RT. Si ottiene una separazione di fasi; la fase superiore viene letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 580nm. Dall'equazione della retta di taratura ottenuta dai valori di assorbanza degli standards si determina la quantità di acido sialico presente nei campioni, che verrà poi normalizzata con il corrispondente quantitativo di proteine.

18. Dosaggio del fosforo fosfolipidico (metodo di Bartlett)

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ **Acido perclorico**

❖ **Reattivo A**

Ammonio Molibdato $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}4\text{H}_2\text{O}]$ 18mM

Acido solforico 137mM

❖ **Reattivo B**

Sodio disolfito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 580mM

Sodio solfito (Na_2SO_3) 190mM

Acido 4-amino 3-idrossinaftalene 1-sulfonico 8mM

PROTOCOLLO

Il dosaggio del fosforo è stato effettuato secondo il metodo Bartlett [protocollo modificato da Bartlett, 1959]. La porzione di silice corrispondente alle bande di FL rilevate con i vapori di iodio viene rimossa e recuperata in una provetta di vetro, a cui si aggiunge acido perclorico e che sono incubate a 200°C per 90 minuti a mineralizzare. Dopo aver fatto raffreddare i campioni a temperatura ambiente, si aggiunge un pari volume di reattivo A e reattivo B (diluito 1:12 in acqua), si incubano a 100°C per 10 minuti e si procede alla lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 625nm. I valori di assorbanza degli standards sono utilizzati per determinare la quantità di fosforo presente nei campioni.

19. Dosaggio colesterolo totale e CL

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ Tampone fosfato di sodio pH 7.4 0.1M

NaH₂PO₄ 0.1M

Na₂HPO₄ 0.1M

❖ Miscela di reazione per dosare il colesterolo libero

Colesterolo esterasi 0.6U/mL

Sodio-colato 10mM

Acido para-idrossifenilacetico (p-HPA)

Colesterolo ossidasi 0.6U/mL

HRP 6U/mL

❖ Miscela di reazione per dosare il colesterolo totale

Sodio-colato 10mM

Acido para-idrossifenilacetico (p-HPA)

Colesterolo ossidasi 0.6U/mL

HRP 6U/mL

PROTOCOLLO

Il protocollo per il dosaggio del colesterolo totale e CL è stato modificato da Heider e Boyett (1978). In seguito ad estrazione dei lipidi, è stato prelevato il volume di FO corrispondente a 70ug di proteine totali su cui è stato effettuato il dosaggio: la FO è stata portata a secco sotto flusso di azoto e risospesa in etanolo e tampone fosfato di sodio. Per il dosaggio del colesterolo totale, alle FO viene aggiunta la miscela di reazione contenente l'enzima colesterolo esterasi, sodio-colato e p-HPA e si incubano i campioni 1 ora a 37°C. In seguito si addiziona la miscela contenente gli enzimi colesterolo ossidasi e HRP e i campioni vengono lasciati 1 ora a 37°C. Per il dosaggio del CL, alle FO si aggiunge la miscela di reazione contenente gli enzimi colesterolo ossidasi e HRP, sodio-colato e p-HPA e si incubano i campioni 1 ora a 37°C. La reazione viene bloccata con l'aggiunta di H₂O e la fluorescenza dei campioni viene letta al Fluorimetro Cary Eclipse Varian alla λ_{EX} 320nm e alla λ_{EM} 406nm. Dall'equazione della retta di taratura ottenuta dai valori di assorbanza degli standards si determina la quantità di CL presente nei campioni.

20. Dosaggio dell'attività di BACE1

SOLUZIONI UTILIZZATE:

- ❖ Tampone di estrazione

- ❖ Tampone di reazione 2X

L'attività dell'enzima BACE1 è stata dosata nelle MEF e nelle frazioni TS e TI. Poiché l'attività catalitica di BACE1 è modulata dai valori di pH, per queste analisi le frazioni TS e TI sono state risospese nella medesima soluzione (MBST), per ottimizzare il confronto dei risultati ottenuti. Al campione è stato aggiunto un pari volume di tampone di estrazione, il substrato e un pari volume di tampone di reazione 2X. Come controllo positivo è stato utilizzato l'enzima ricombinante fornito dal kit. I campioni sono stati incubati 60 minuti a 37°C al buio e letti in una piastra per lettura in fluorescenza tramite Victor3 1420 Multilabel Counter alla λ_{EX} 335-355nm e alla λ_{EM} 495-510nm.

21. Separazione elettroforetica

SOLUZIONI UTILIZZATE:

❖ **Porzione di corsa del gel (Running Solution)**

Bis-acrilamide 12%

Tris-HCl 0.375M pH 8.9

SDS 0.1%

Ammonio Persolfato (APS) 0.1%

Tetrametiletilendiammina (TEMED) 0.05%

❖ **Porzione di separazione del gel (Stacking Solution)**

Bis-acrilamide 6%

Tris-HCl 0.625M pH 6.8

SDS 0.1%

APS 0.1%

TEMED 0.05%

❖ **Tampone di denaturazione [Laemmli Buffer (ZAP)] 4X**

SDS 8%

Tris-HCl 0.2M pH 6.8

Glicerolo 40%

Blu di Bromofenolo 0.4%

β -mercaptoetanololo 4%

❖ **Tampone di corsa (Running Buffer)**

Tris 25mM

Glicina 192mM

SDS 0.1%

PROTOCOLLO

La separazione elettroforetica è stata effettuata utilizzando gel di poli-acrilammide al 10%.

Per l'analisi dell'espressione e della distribuzione nei domini di membrana delle proteine di nostro interesse si caricano 20ug di proteine delle MEF e il corrispondente volume per le frazioni TS e TI del medesimo campione.

Ai campioni è stato aggiunto ZAP 4X e acqua in modo da caricare lo stesso volume in ogni pozzetto; i campioni vengono bolliti a 100°C per 5 minuti, centrifugati velocemente e caricati con una siringa Hamilton da 50uL.

La corsa elettroforetica avviene nella cameretta Biorad applicando una differenza di potenziale di 80V – 100V.

22. Trasferimento su nitrocellulosa, immunodecorazione e rivelazione con chemiluminescenza

SOLUZIONI UTILIZZATE

❖ Tampone di trasferimento (Transfer Buffer)

Tris 25mM

Glicina 192mM

SDS 0.013%

Metanolo 20%

❖ Ponceau, Sigma

0.1% PonceauS in 5% Acido Acetico

❖ TBS 1X

Tris 20mM

NaCl 137mM

pH 7.6

❖ TBS-T 0.1%

Tris 20mM

NaCl 137mM

pH 7.6

TWEEN 20 0.1%

❖ TBS-T 0.2%

Tris 20mM

NaCl 137mM

pH 7.6

TWEEN 20 0.2%

❖ TBS-T 0.1% LATTE 5%

❖ TBS-T 0.2% BSA 3%

PROTOCOLLO

Terminata la corsa elettroforetica, le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa a 4°C applicando una corrente elettrica di 250mA.

Al termine del trasferimento, le proteine totali separate elettroforeticamente sono rivelate mediante colorazione con rosso Ponceau; l'immagine viene acquisita utilizzando ImageQuant LAS 4000.

Gli anticorpi utilizzati sono i seguenti: anti cPLA₂, anti COX2, anti BACE1, anti APP, anti Na⁺/K⁺ ATPasi e anti CD81.

La membrana di nitrocellulosa viene incubata in TBS-T 0.1% LATTE 5% o TBS-T 0.2% BSA 3% 30 minuti a 37°C per saturare i siti aspecifici (blocking); l'anticorpo primario è incubato in TBS-T 0.1% LATTE 5% o TBS-T 0.2% BSA 3% (diluizione 1:1000 per l'anticorpo anti COX2, anti BACE1 e anti Na⁺/K⁺ ATPasi, 1:750 per l'anticorpo anti APP, e 1:200 per l'anticorpo anti cPLA₂ e anti CD81), per 16 ore a 4°C (o 2 ore RT); l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima HRP è incubato per un'ora RT al buio. Dopo aver elivinato l'eccesso di anticorpo, la membrana viene rivelata tramite ECL utilizzando lo strumento ImageQuant LAS 4000.

RISULTATI

23. Valutazione della vitalità cellulare in seguito a deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) in cellule RBE4

Le cellule RBE4 sono state sottoposte a 3 ore di deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) e le analisi sono state condotte dopo 1 e 24 ore dal ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche (R 1h e R 24h).

La vitalità cellulare è stata valutata tramite saggio MTT. Come mostrato in figura 10, il trattamento determina la riduzione della vitalità cellulare del 25% (R 1h), che si mantiene inalterata fino a 24 ore dal ripristino post-OGD. Questi dati, oltre ad indicare un significativo effetto citotossico del trattamento, suggeriscono anche una ripresa proliferativa, anche se parziale, delle cellule ancora vitali, durante le 24 ore di ripristino delle normali condizioni di coltura.

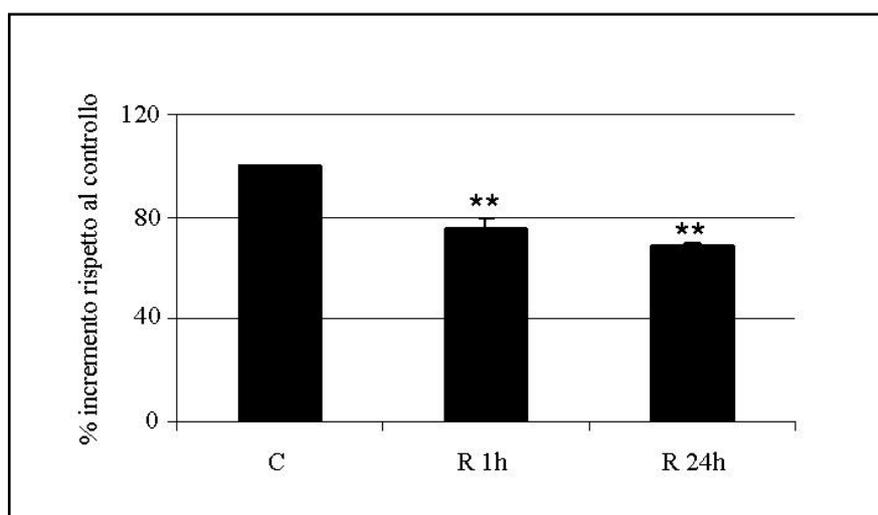


Figura 10. Effetto della deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD) sulla vitalità di cellule RBE4.

Le cellule RBE4 sono state sottoposte ad OGD e la vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT dopo 1 e 24 ore di ripristino delle normali condizioni di coltura (R 1h e R 24h).

I dati mostrati (media \pm errore assoluto) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

24. Analisi dei livelli di espressione dei fosfolipidi (FL) di membrana in cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD

E' stato valutato l'effetto del trattamento OGD e del ripristino delle normali condizioni di coltura sui livelli di espressione delle principali classi lipidiche presenti in cellula.

In primo luogo sono stati studiati i livelli dei FL di membrana. L'analisi mediante cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography, TLC), ha dimostrato che, in cellule RBE4, le condizioni ischemiche non promuovono significative variazioni dei livelli di FL fino a 24 ore di ripristino post-OGD, sebbene siano presenti piccole fluttuazioni nei quantitativi reciproci di fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e sfingomieline (SM) (figura 11).

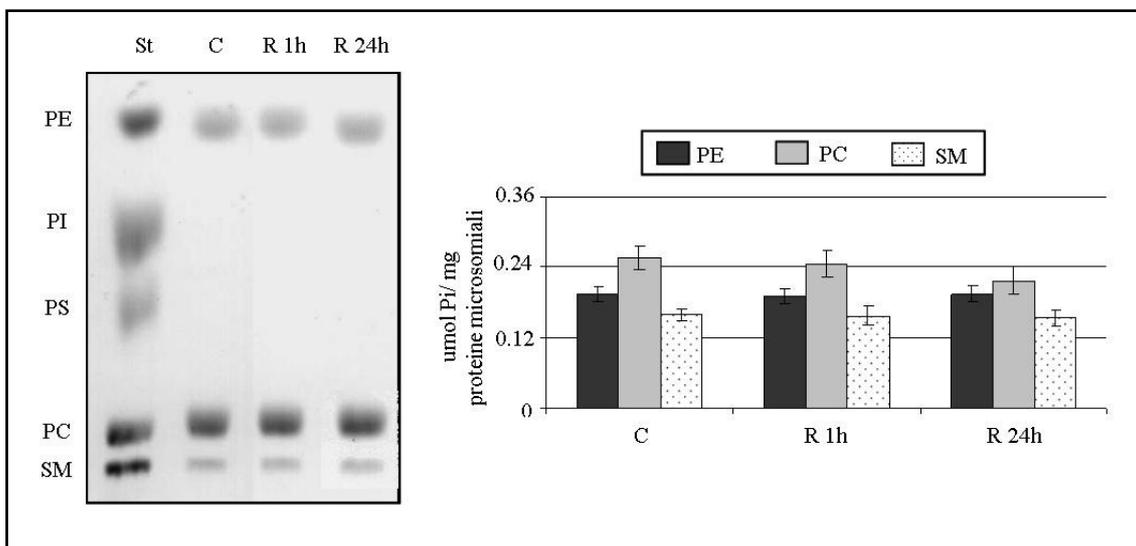


Figura 11. Livelli di fosfolipidi (FL) in cellule RBE4 sottoposte a trattamento OGD e ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche.

Le cellule RBE4 sottoposte al trattamento di OGD e al ripristino delle normali condizioni di coltura per 1 e 24 ore (R 1h e R 24h), sono state raccolte in soluzione ipotonica e le frazioni arricchite in membrane (MEF) sono state ottenute mediante ultracentrifugazione. In seguito ad estrazione dei lipidi, i FL sono stati separati tramite TLC con la miscela cloroformio: metanolo: acido acetico: acqua 60:45:4:2 (v:v:v:v) e visualizzati con i vapori di iodio. Ciascuna banda rivelata è stata grattata dalla lastra e dosata per il quantitativo di fosforo inorganico (P_i) secondo il metodo Bartlett. I lipidi sono stati identificati in seguito alla separazione cromatografica tramite lipidi standard (sfingomieline, SM, fosfatidilcolina, PC, fosfatidilinositolo, PI, fosfatidilserina, PS e fosfatidiletanolamina, PE) caricati sulla stessa lastra. I dati mostrati (media \pm SEM) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

25. Valutazione dei livelli di espressione dei gangliosidi (GG) di membrana in cellule RBE4 dopo OGD

Lo studio dei livelli di espressione dei GG di membrana dimostra una significativa diminuzione (20%) all'R 1h dei livelli di GM2 e GM3, i GG maggiormente espressi in cellule RBE4, che risultano paragonabili ai valori del controllo dopo 24 ore di ripristino post-OGD (figura 12A). Il dosaggio dell'acido sialico associato ai lipidi, pur non risultando statisticamente significativo, conferma la riduzione di GG osservata all'R 1h (figura 12B).

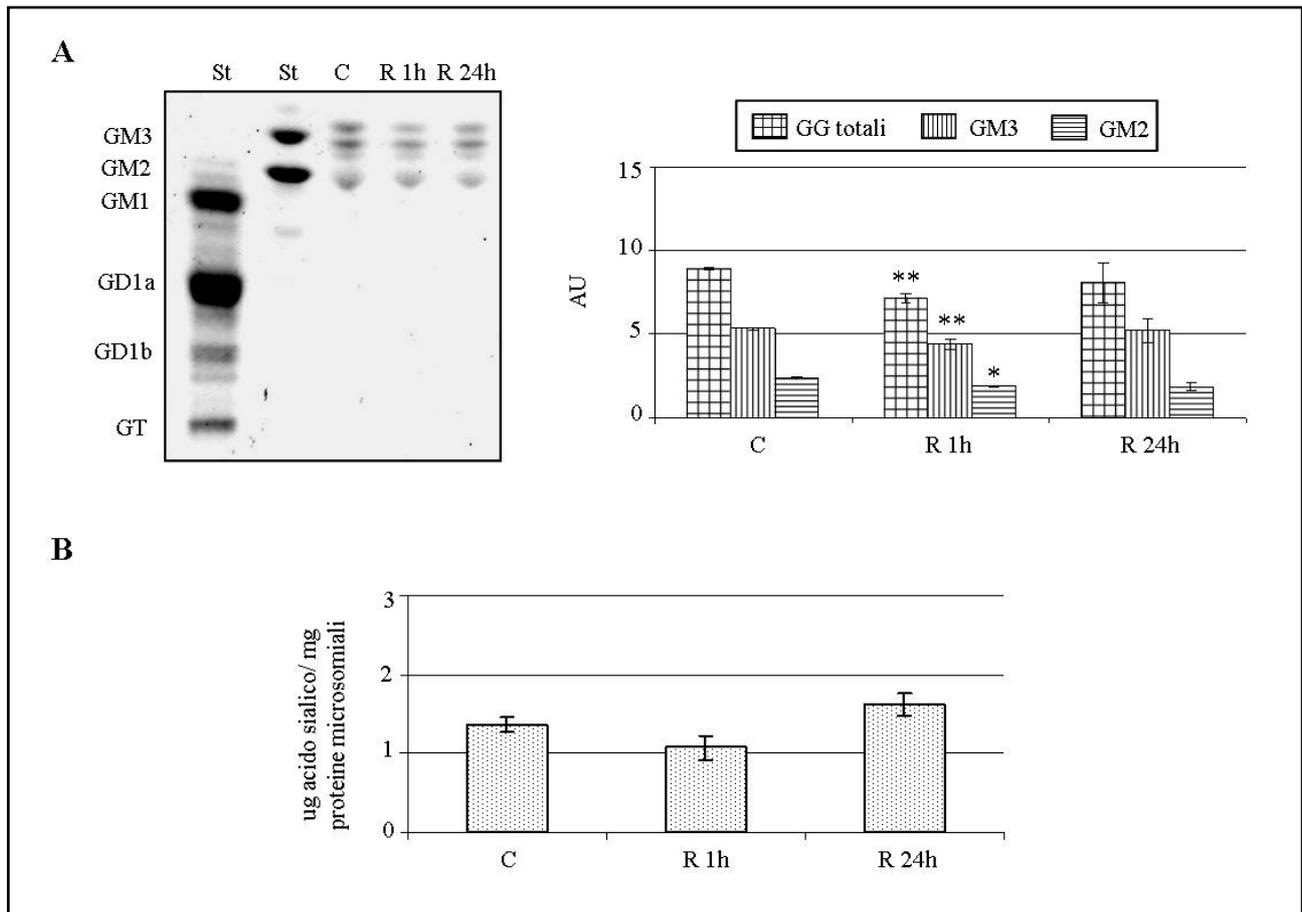


Figura 12. Livelli di espressione dei gangliosidi (GG) di membrana in cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD.

Le cellule RBE4 sottoposte al trattamento di OGD e al ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche per 1 e 24 ore (R 1h e R 24h) sono state raccolte in soluzione ipotonica e le MEF sono state ottenute per ultracentrifugazione.

A –Espressione dei GG di membrana. In seguito ad estrazione dei lipidi, i GG sono stati separati tramite TLC con la miscela cloroformio: metanolo: 0.2% CaCl_2 50:42:11 (v:v:v) e visualizzati con il reattivo di Ehrlich; le bande ottenute sono state quantificate densitometricamente. I lipidi sono stati identificati in seguito alla separazione cromatografica tramite lipidi standard caricati sulla stessa lastra.

B – Dosaggio delle quantità di acido sialico associato ai lipidi. I livelli di acido sialico associato ai lipidi sono stati dosati secondo il metodo di Svennerholm; i valori ottenuti sono stati normalizzati per il quantitativo proteico di ciascun campione.

I dati mostrati (media \pm SEM) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

26. Effetto del trattamento OGD sui livelli di colesterolo libero (CL) di membrana in cellule RBE4

Infine è stato indagato l'effetto del trattamento sulla quota di CL di membrana. In cellule RBE4, l'OGD determina un significativo incremento (20% circa) della quantità di CL in membrana all'R 1h. Durante il ripristino della normossia e normoglicemia, i suoi quantitativi diminuiscono, mantenendosi però maggiori rispetto a quelli basali fino all'R 24h (figura 13).

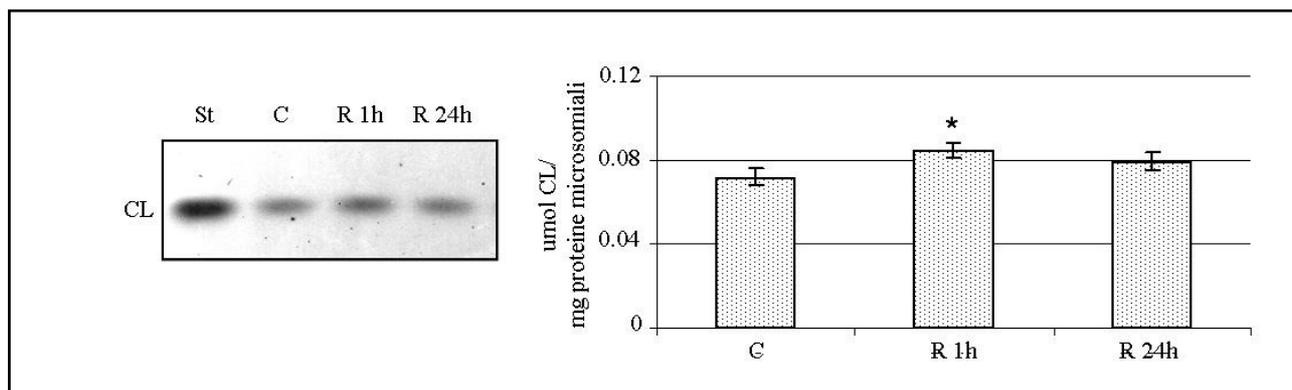


Figura 13. Analisi dei livelli di colesterolo libero (CL) di membrana in cellule RBE4 dopo OGD

In seguito al trattamento OGD e al ripristino delle normali condizioni di coltura per 1 e 24 ore (R 1h e R 24h), le MEF delle cellule RBE4 sono state ottenute per ultracentrifugazione e sono stati estratti i lipidi. Il CL è stato separato tramite TLC nella miscela esano: dietilene: acido acetico 20:35:1 (v:v:v), identificato tramite lipidi standard caricati sulla stessa lastra e visualizzato con un reattivo a base di anisaldeide. Le quantità di CL sono state dosate mediante il metodo Heider e Boyett e normalizzate per il quantitativo proteico di ciascun campione.

I dati mostrati (media \pm SEM) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$).

27. Analisi dei livelli di CL e colesterolo esterificato (CE) in cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD

Al fine di comprendere le modalità di aumento della quota di CL in membrana, sono state separate ed analizzate le componenti di CL e CE presenti nell'omogenato totale di cellule RBE4 in seguito a trattamento OGD. Dopo 1 ora dal ripristino delle condizioni di normossia e normoglicemia abbiamo osservato una netta riduzione dei livelli di CE ed un parallelo incremento della quota di CL, che suggerisce una redistribuzione delle due componenti in cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD.

Il grafico mostra i livelli di colesterolo totale e di CL determinati mediante dosaggio enzimatico; la quantità di CE è calcolata per sottrazione (figura 14).

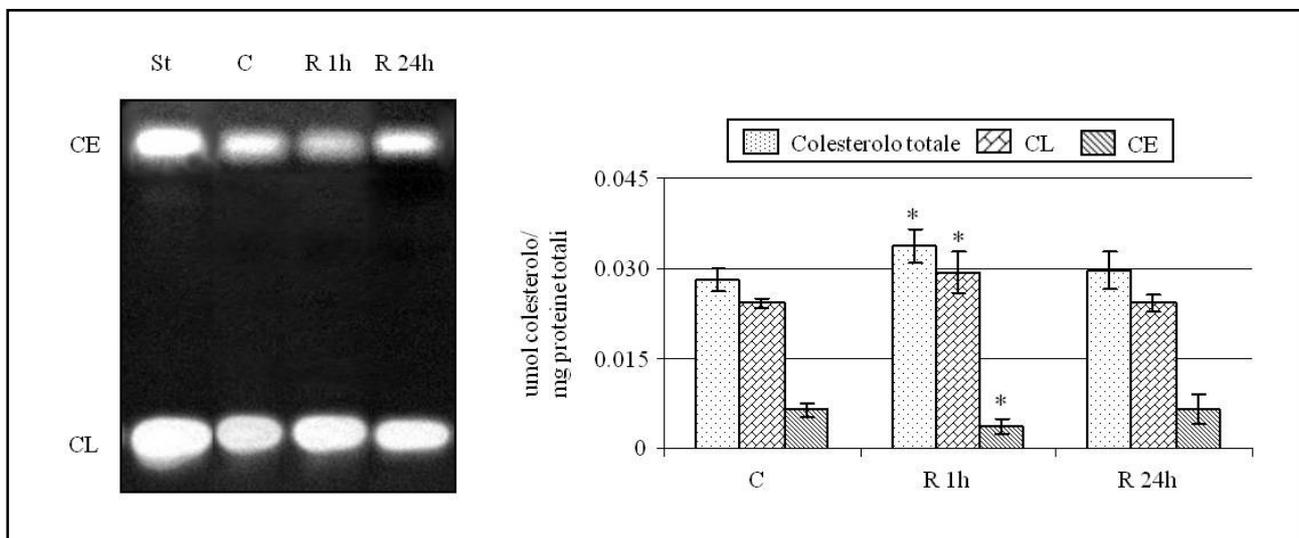


Figura 14. Livelli di CL e colesterolo esterificato (CE) in cellule RBE4 in risposta ad OGD e ripristino delle normali condizioni di coltura.

Le cellule RBE4 sono state sottoposte ad OGD e al ripristino della normossia e normoglicemia (R) per 1 e 24 ore e raccolte in soluzione ipotonica. In seguito ad estrazione dei lipidi, le componenti cellulari di CL e CE sono state separate mediante TLC dapprima nella miscela etilacetato: benzene 1:5 (v:v) e, dopo aver fatto asciugare la lastra, nella miscela eptano: benzene 97: 3 (v:v) e visualizzate con il reagente di Liebermann-Burchard. I lipidi sono stati identificati in seguito alla separazione cromatografica tramite lipidi standard caricati sulla stessa lastra.

I livelli di CL e colesterolo totale sono stati determinati tramite dosaggio secondo il metodo Heider e Boyett e normalizzati per il quantitativo proteico di ciascun campione; i quantitativi di CE sono stati calcolati per sottrazione. I dati mostrati (media \pm SEM) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$).

28. Valutazione della fluidità di membrana delle cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD

Le variazioni lipidiche di membrana partecipano alle modificazioni della sua fluidità. E' stata pertanto valutata questa importante proprietà della membrana utilizzando la sonda fluorescente 1,6-difenil-1,2,5-esatriene (DPH) e calcolando l'anisotropia di fluorescenza (r) dei campioni come descritto in materiali e metodi.

I dati riportati in figura 15 mostrano un significativo aumento dell'anisotropia di fluorescenza (6%) che, essendo inversamente proporzionale alla fluidità di membrana, indica una riduzione di quest'ultima all'R 1h. Dopo 24 ore di ripristino post-OGD, i valori di anisotropia sono simili al controllo, indicando il ritorno della fluidità di membrana alle condizioni basali.

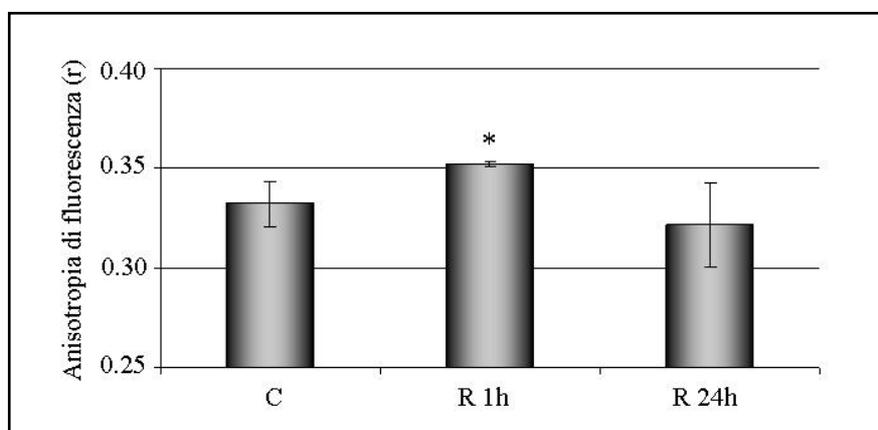


Figura 15. Effetto del trattamento OGD e del ripristino delle condizioni normossiche e normoglucidiche sulla fluidità di membrana di cellule RBE4.

Le cellule RBE4 sono state sottoposte ad OGD e al ripristino delle normali condizioni di coltura (R) per differenti tempistiche (1h e 24h) e raccolte come descritto in materiali e metodi. La fluidità di membrana dei differenti campioni è stata saggiata mediante misurazioni dell'anisotropia di fluorescenza della sonda 1,6-difenil-1,2,5-esatriene (DPH).

I dati mostrati (media \pm SEM) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$).

29. Dosaggio dell'attività della β -secretasi (BACE1) e valutazione dei livelli di espressione delle proteine APP e BACE1 in cellule RBE4 in risposta a OGD

Il processamento della proteina precursore dell'amiloide (APP), che può generare il peptide tossico $A\beta_{42}$, avviene in membrana ed è modulato dalla composizione lipidica dell'ambiente circostante le secretasi coinvolte nel processo [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Vestergaard et al., 2010]. Avendo precedentemente osservato, in cellule RBE4, in risposta al trattamento OGD un significativo aumento della produzione di peptide $A\beta_{42}$ [Bulbarelli et al., 2012] le variazioni lipidiche ed l'aumento di rigidità della membrana, abbiamo valutato l'attività della β -secretasi (BACE1) e i livelli di espressione delle proteine APP e BACE1 direttamente a livello di membrana. In cellule RBE4 l'attività di BACE1, dosata come descritto in materiali e metodi, aumenta significativamente (45%) in risposta ad OGD e, dato ancora più interessante, si mantiene elevata fino a 24 ore dal ripristino delle normali condizioni di coltura (figura 16A).

La valutazione dell'espressione proteica di APP e BACE1 in membrana dimostra l'incremento dei livelli proteici di APP fino a 24 ore dal ripristino post-OGD e l'aumento transiente della proteina BACE1 all'R 1h (figura 16B).

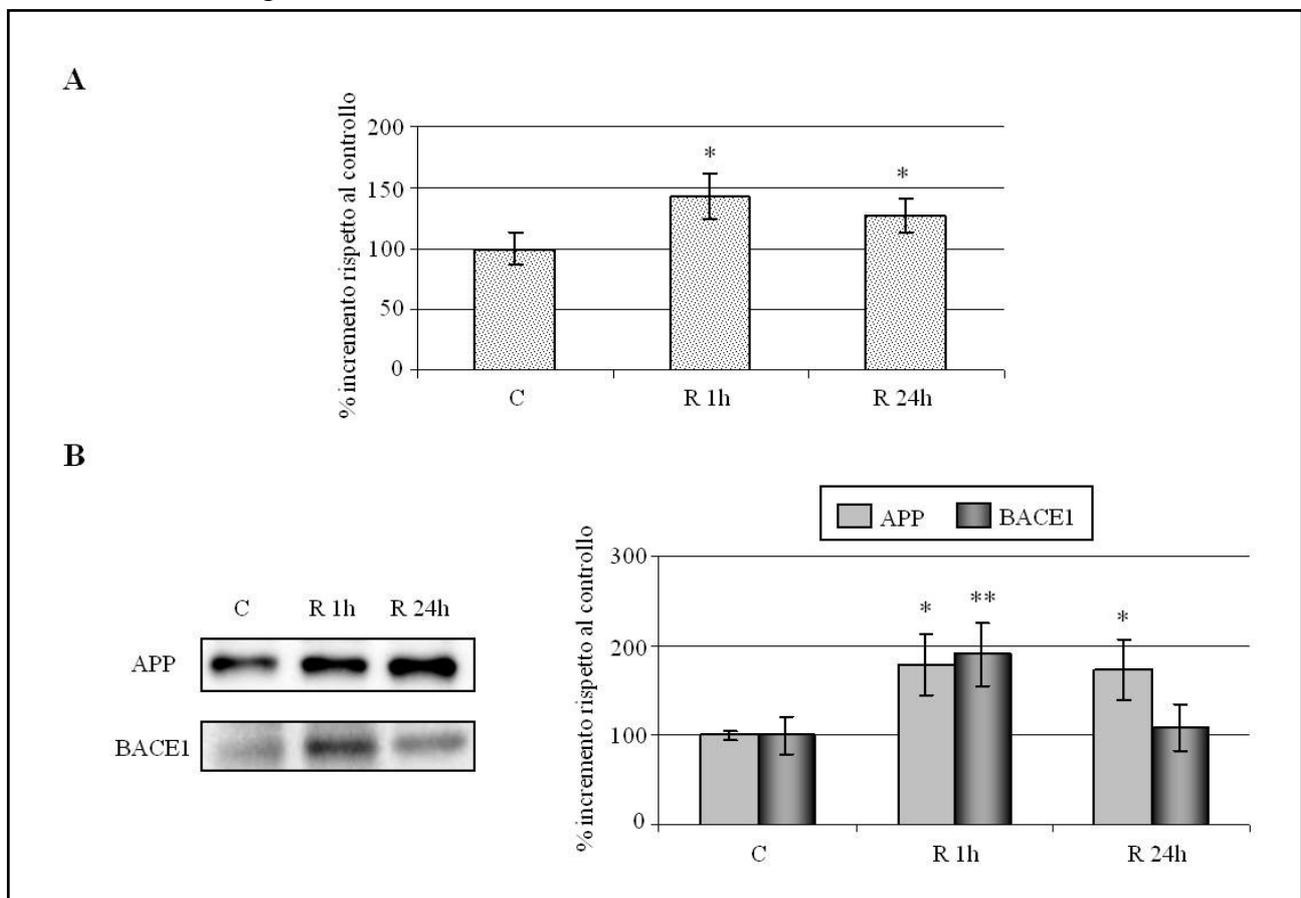


Figura 16. Attività di BACE1 e livelli di espressione proteica di APP e BACE1 in MEF di cellule RBE4 dopo trattamento OGD.

In seguito ad OGD e al ripristino delle normali condizioni di coltura (R) per 1 e 24 ore, le cellule RBE4 sono state raccolte in soluzione ipotonica e le MEF sono state ottenute per ultracentrifugazione.

A – Saggio dell'attività di BACE1. Uguali quantitativi dei differenti campioni (in volume) sono stati analizzati come descritto in materiali e metodi e i valori di fluorescenza ottenuti sono stati normalizzati per il quantitativo proteico di ciascuna MEF.

B – Livelli proteici di APP e BACE1. Uguali quantitativi proteici dei differenti campioni sono stati analizzati mediante separazione elettroforetica, trasferimento su nitrocellulosa, immunodecorazione con anticorpi specifici e rivelazione per chemiluminescenza (ECL). La colorazione con rosso Ponceau delle intere corsie è stata utilizzata per la normalizzazione delle bande.

I dati mostrati (media \pm errore assoluto) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

30. Analisi dell'attività di BACE1 e della localizzazione delle proteine APP e BACE1 in frazioni TRITON X-100 solubili (TS) e TRITON X-100 insolubili (TI) di membrana in risposta ad OGD

È stata inoltre valutata l'attività della β -secretasi (BACE1) e la localizzazione delle proteine APP e BACE1 in frazioni TRITON X-100 solubili (TS) e TRITON X-100 insolubili (TI) di membrana in risposta al trattamento OGD.

Le condizioni ischemiche promuovono una significativa riduzione dell'attività di BACE1 nelle frazioni TI di membrana, valutata come rapporto TI/TS, sino a 24 ore dal ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche (45%) (figura 17A).

Si osserva inoltre la riduzione dei livelli di APP e BACE1 nelle frazioni TI di membrana e un parallelo aumento di entrambe le proteine nelle frazioni TS. In particolare, le variazioni di localizzazione, rappresentate nel grafico come rapporto TI/TS, risultano statisticamente significative dopo 1 ora dal ripristino delle normali condizioni di coltura per la proteina BACE1 (riduzione del 50%) e fino a 24 ore per la proteina APP (riduzione del 55%) (figura 17B).

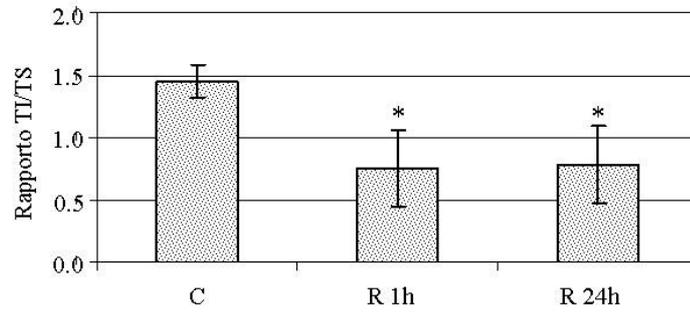
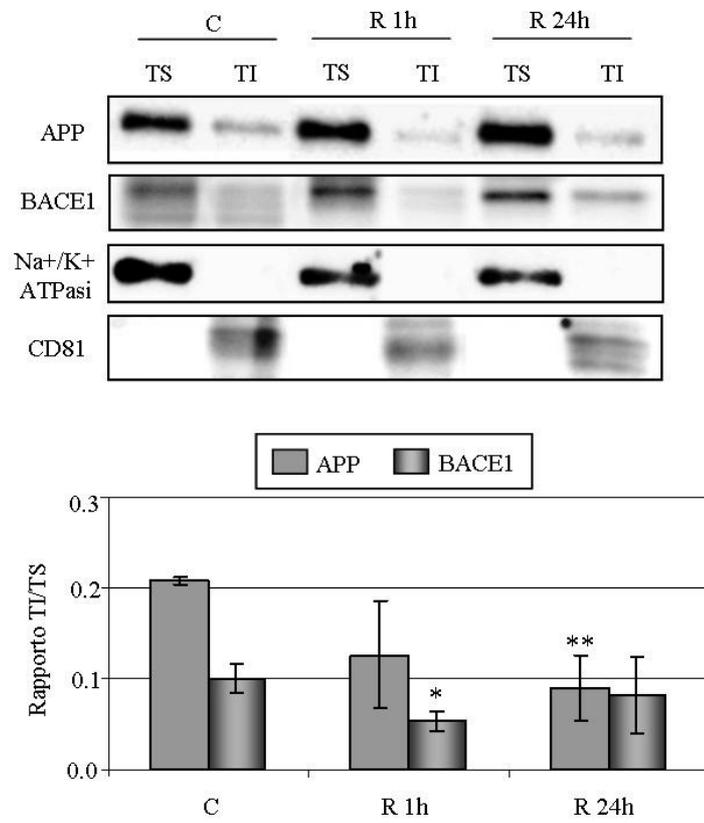
A**B**

Figura 17. Analisi dell'attività di BACE1 e della localizzazione delle proteine APP e BACE1 in frazioni TRITON X-100 solubili (TS) e TRITON X-100 insolubili (TI) di membrana di cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD.

Le MEF di cellule RBE4 sottoposte ad OGD e al ripristino delle normali condizioni di coltura (R) per 1 e 24 ore sono state ottenute per ultracentrifugazione. Le frazioni TS e TI di membrana sono state separate in seguito al trattamento con 1% di TRITON X-100 per 30 minuti a 4°C e ultracentrifugazione.

A – Dosaggio dell'attività di BACE1. L'attività di BACE1 è stata dosata utilizzando un ugual volume di frazioni TS e TI come descritto in materiali e metodi e i valori ottenuti sono stati normalizzati con il quantitativo proteico corrispondente alla MEF di ciascun campione. I dati sono mostrati in grafico come rapporto TI/TS.

B – Espressione proteica di APP e BACE1. Le frazioni TS e TI dei differenti campioni sono state analizzate mediante separazione elettroforetica, trasferimento su nitrocellulosa, immunodecorazione con anticorpi specifici e rivelazione per chemiluminescenza (ECL). Sulla base delle precedenti valutazioni effettuate su uguali quantitativi proteici di MEF, per ciascun campione è stato utilizzato il corrispondente volume di frazioni TS e di frazioni TI per l'analisi della distribuzione delle proteine APP e BACE1 in membrana. Le proteine Na⁺/K⁺ ATPasi e CD81 sono state utilizzate come marcatori della frazione TS e TI rispettivamente. La colorazione con rosso Ponceau delle intere corsie è stata utilizzata per la normalizzazione delle bande. I livelli proteici sono riportati in grafico come rapporto TI/TS.

I dati mostrati (media ± errore assoluto) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = p<0.05, ** = p < 0.01).

31. Effetto del trattamento OGD sulla localizzazione di CL in frazioni TS e TI di membrana in cellule RBE4

L'inattesa riduzione sia dei livelli proteici di APP e BACE1, sia dell'attività della β -secretasi in frazioni TI di membrana, che comprendono i lipid rafts, ci ha portati ad analizzare la localizzazione del CL, la cui quota totale in membrana aumenta in risposta al trattamento.

I dati riportati in figura 18 mostrano l'incremento dei livelli di espressione di CL in entrambe le frazioni di membrana (TS e TI) dopo il trattamento OGD, suggerendo che il suo accumulo possa dipendere da un meccanismo non regolato.

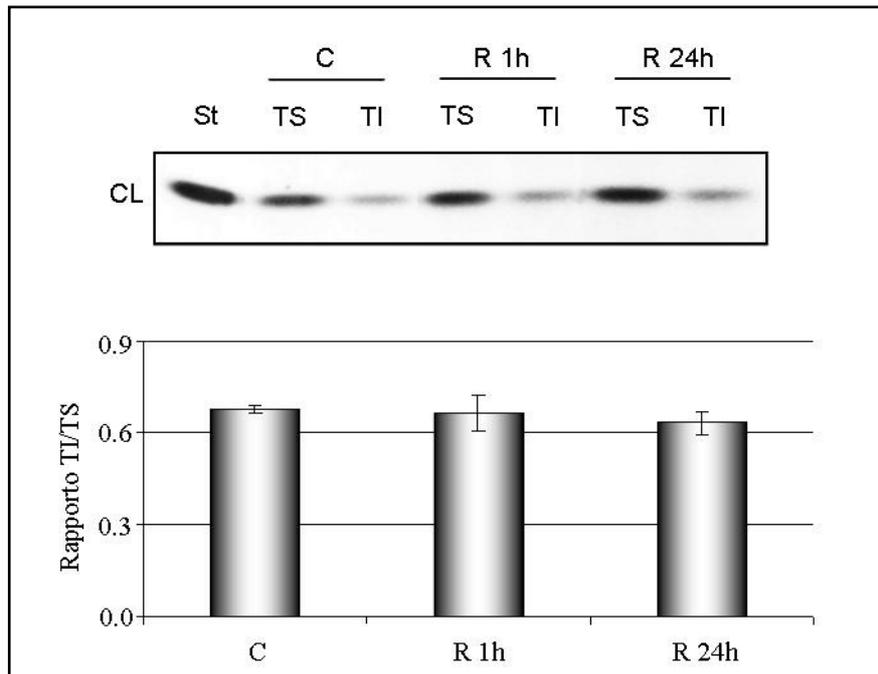


Figura 18. Analisi dei livelli di CL in frazioni TS e TI di membrana di cellule RBE4 in risposta al trattamento OGD.

Le MEF di cellule RBE4 sottoposte ad OGD e al ripristino delle normali condizioni di coltura (R) per 1 e 24 ore sono state ottenute per ultracentrifugazione. Le frazioni TS e TI di membrana sono state separate in seguito al loro trattamento con 1% di TRITON X-100 per 30 minuti a 4°C e ultracentrifugazione.

In seguito ad estrazione dei lipidi, il CL è stato separato mediante TLC nella miscela esano: dietilere: acido acetico 20:35:1 (v:v:v), visualizzato con il reattivo a base di anisaldeide e le bande quantificate densitometricamente. I lipidi sono stati identificati in seguito alla separazione cromatografica tramite lipidi standard caricati sulla stessa lastra. Sulla base delle precedenti valutazioni effettuate su volumi corrispondenti a uguali quantitativi proteici delle MEF, per ciascun campione è stato utilizzato lo stesso volume di frazioni TS e di frazioni TI per l'analisi della distribuzione del CL in membrana. I livelli di CL sono riportati in grafico come rapporto TI/TS.

I dati mostrati (media \pm SEM) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$).

32. Effetto del trattamento OGD sui livelli di espressione delle proteine cPLA₂ e COX2

Abbiamo inoltre analizzato, in seguito ad OGD, l'espressione proteica della fosfolipasi citosolica A₂ (cPLA₂) in membrana e della cicloossigenasi 2 (COX2) in cellule RBE4.

In accordo con la nostra ipotesi, la figura 19A mostra un significativo aumento dei livelli di cPLA₂ nelle MEF all'R 1h che si mantiene sino all'R 24h (40%). Inoltre il trattamento OGD promuove l'incremento dei livelli della proteina COX2 nell'omogenato totale in modo tempo dipendente sino a 24 ore dal ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche (260%) (figura 19B).

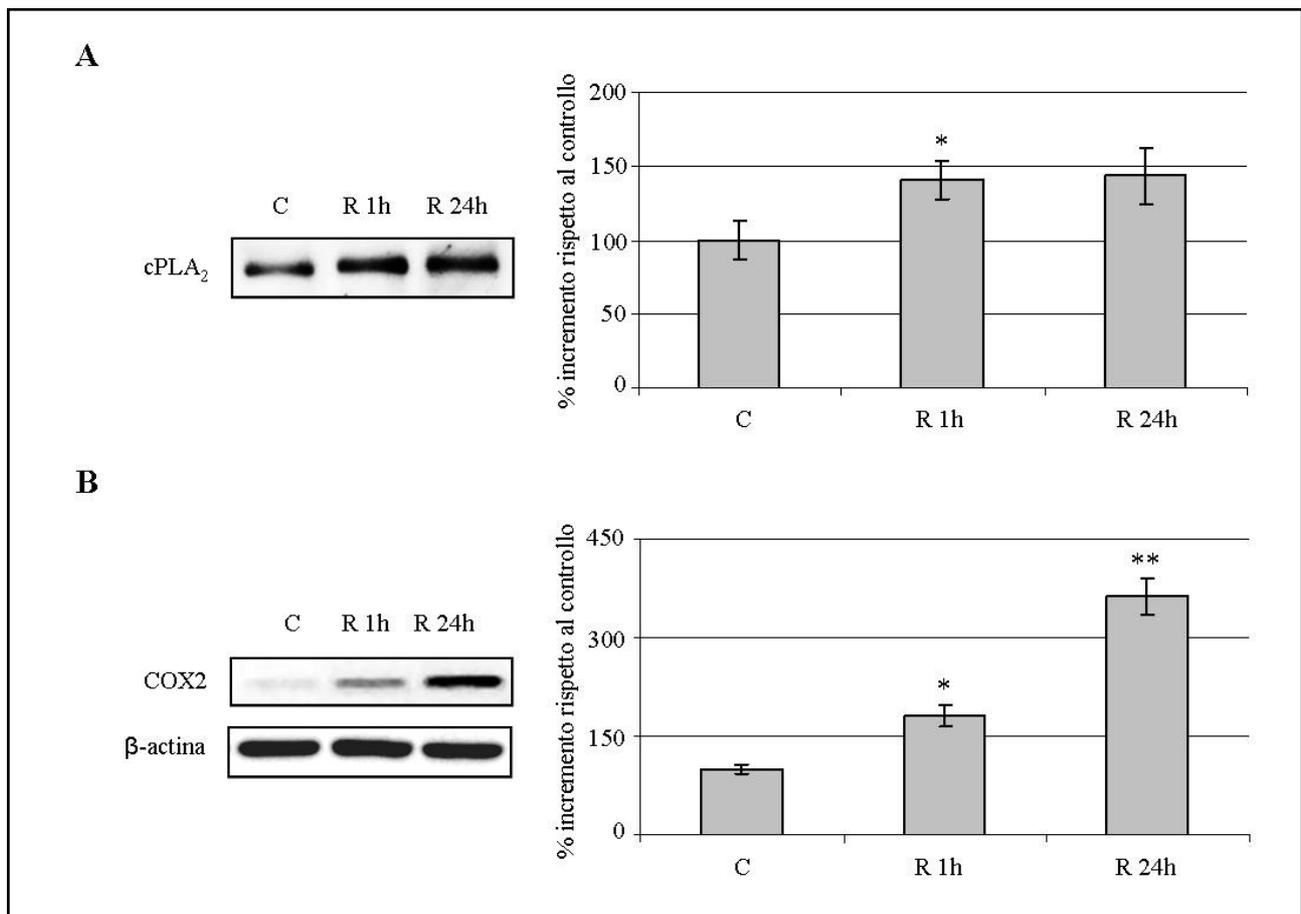


Figura 19. Aumento dei livelli proteici di cPLA₂ e COX2 in cellule RBE4 dopo OGD e ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche.

Le cellule RBE4 sono state sottoposte ad OGD e al ripristino delle normali condizioni di coltura (R) per differenti tempistiche (1 e 24 ore) e raccolte in soluzione ipotonica.

A – Livelli proteici di cPLA₂. Le MEF sono state ottenute per ultracentrifugazione. Uguali quantitativi proteici dei differenti campioni sono stati analizzati mediante separazione elettroforetica, trasferimento su nitrocellulosa, immunodecorazione con anticorpi specifici e rivelazione per chemiluminescenza (ECL). La colorazione con Ponceau delle intere corsie è stata utilizzata per la normalizzazione delle bande.

B – Espressione proteica di COX2. Uguali quantitativi proteici di omogenato totale dei differenti campioni sono stati analizzati mediante separazione elettroforetica, trasferimento su nitrocellulosa, immunodecorazione con anticorpi specifici e rivelazione per chemiluminescenza (ECL). La valutazione dei livelli proteici di β-actina è stata utilizzata per la normalizzazione delle bande.

I dati mostrati (media ± errore assoluto) derivano da 3 differenti esperimenti; la significatività statistica è stata calcolata mediante test T di Student rispetto ai controlli (* = p < 0.05, ** = p < 0.01).

DISCUSSIONE

La barriera ematoencefalica (BEE) costituisce l'interfaccia tra il torrente ematico ed il sistema nervoso centrale (SNC) e, mantenendo l'omeostasi cerebrale entro ristretti limiti fisiologici, ne garantisce il corretto funzionamento. Il flusso di sostanze in entrata e in uscita dall'encefalo è infatti finemente regolato a livello delle cellule endoteliali che costituiscono la BEE attraverso l'elevato numero di giunzioni strette (tight junctions, TJ) e l'espressione asimmetrica di trasportatori specifici delle membrane apicali e basolaterali [Enciu et al., 2013; Lakhan et al., 2013; Abbott and Friedman, 2012; Wolburg et al., 2009; Hawkins and Davis, 2005; Ballabh et Al., 2004].

Alla regolazione della permeabilità della BEE partecipano in più i microdomini di membrana (lipid rafts), porzioni di membrana eterogenee arricchite in colesterolo e sfingolipidi le cui dimensioni sono comprese tra 10 e 200nm [Di Paolo and Kim, 2011; Rushworth and Hooper, 2010; Lingwood and Simmons, 2010; Patel and Insel, 2009; Wennekes et al., 2009]. Le proteine che costituiscono le TJ sono associate ai lipid rafts e la specifica composizione lipidica di questi domini supporta e mantiene la polarizzazione delle cellule endoteliali di barriera [Dodelet-Devillers et al., 2009; Wolburg et al., 2009; Sugibayashi et al., 2009; McCaffrey et al., 2007].

Considerando l'importanza del ruolo della BEE nella modulazione dell'omeostasi cerebrale, danni morfologici e funzionali a carico di questo distretto possono risultare cruciali nella catena di eventi che porta al progressivo sviluppo delle diverse patologie del SNC [Sagare et al., 2012; Grinberg et al., 2012; Jaynes and Provias, 2011].

Tra le numerose condizioni dannose per la BEE, l'ischemia cerebrale, causando la rottura delle TJ a livello endoteliale e la perdita diffusa di sostanze attraverso la parete vasale necrotica, promuove uno stato patologico che comporta di conseguenza l'aumento della permeabilità paracellulare della barriera [Lakhan et al., 2013; Jablonski et al., 2011; An and Xue, 2009; Pluta and Ułamek, 2008; Koto et al., 2007].

È noto inoltre che ripetuti episodi ischemici, comportando una più generale riduzione del flusso ematico a livello cerebrale, aumentano il rischio di insorgenza della malattia di Alzheimer (AD) [Kalaria et al., 2012; Sagare et al., 2012; Yang and Rosenberg, 2011; Jaynes and Provias, 2011; Jablonski et al., 2011; Iadecola, 2010; Ruitenberg et al. 2005; Vermeer et al. 2003]. I meccanismi cellulari che si attivano in modelli neuronali sottoposti a condizioni ischemiche sono, infatti, associati anche al processamento amiloidogenico della Proteina Precursore dell'Amiloide (APP) [Guglielmotto et al., 2009; Zhang et al., 2007; Xue et al., 2006; Sun et al., 2006]. In più è stata recentemente dimostrata una significativa produzione ed accumulo di peptide A β ₄₂ anche in un modello cellulare di BEE [Bulbarelli et al., 2012]. Il taglio amiloidogenico di APP mediato dalla β -

e γ -secretasi è un evento molecolare che ha sede in membrana e alla cui regolazione partecipa l'intorno lipidico che circonda la proteina APP e le secretasi [Maulik et al., 2012; Zhang et al., 2011; Di Paolo and Kim, 2011; Verstergaard et al., 2010].

L'omeostasi cellulare dei lipidi è, infatti, coinvolta nella modulazione di numerosi processi fisiologici, tra cui la comunicazione cellula-cellula, la trasduzione del segnale, la trasmissione nervosa e la produzione di ormoni. Infine, alterazioni del metabolismo lipidico sono associate a patologie, quali ad esempio malattie neurodegenerative, l'aterosclerosi e il diabete [Zambo et al., 2013; Ernst and Bruegger, 2013; D'angelo et al., 2013; Vance, 2012; Salmina et al., 2010; Wenneckes et al., 2009].

Nonostante siano note la correlazione fisiopatologica tra ischemia e processamento amiloidogenico, potenzialmente regolato dall'ambiente lipidico, e l'importanza della struttura della membrana di cellule di barriera per il mantenimento della funzionalità e delle proprietà della stessa, è stato finora poco studiato l'effetto di un evento ischemico sulla composizione lipidica di membrana nel distretto vascolare cerebrale [Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Verstergaard et al., 2010; Wenneckes et al., 2009].

Lo scopo del presente progetto è stato pertanto quello di studiare il ruolo delle variazioni delle principali classi di lipidi cellulari e le modificazioni nella fluidità di membrana di cellule endoteliali di BEE sottoposte *in vitro* a deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD, modello *in vitro* di ischemia). Lo studio si è prefissato, inoltre, di trovare una correlazione funzionale tra le variazioni lipidiche e la produzione di elevati livelli di $A\beta_{42}$ [Bulbarelli et al., 2012]. Lo studio è stato condotto in cellule RBE4 (linea di cellule endoteliali del microcircolo cerebrale di ratto), utilizzate come modello *in vitro* di BEE, sottoposte per 3 ore a OGD. Sulla base di precedenti studi [Bulbarelli et al., 2012], le analisi sono state condotte sulle cellule dopo 1 e 24 ore dal ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche.

Come già dimostrato, il trattamento OGD promuove, in cellule RBE4, una riduzione della vitalità del 25% rispetto alle condizioni controllo, dopo 1 ora di ripristino delle normali condizioni di coltura (R 1h), senza tuttavia indurre un'elevata mortalità cellulare, che si mantiene infatti percentualmente invariata anche dopo 24 ore dal ripristino (R 24h) (figura 10). La medesima percentuale di vitalità al tempo R 1h e R 24h indica che il trattamento OGD induce un'immediata sofferenza cellulare, senza tuttavia scatenare meccanismi irreversibili di morte cellulare tanto che si osserva la successiva ripresa proliferativa nella maggior parte della popolazione cellulare.

L'evidenza sperimentale riscontrata risulta pertanto compatibile con le nostre esigenze, permettendoci di analizzare le variazioni lipidiche di membrana.

Sono quindi stati valutati, in frazioni arricchite di membrana (MEF), i livelli di espressione delle principali classi di lipidi presenti in cellula: fosfolipidi (FL), gangliosidi (GG) e colesterolo libero/esterificato (CL/CE) [Nelson and Cox, 2008].

La popolazione di FL endogeni prevalenti nelle cellule RBE4 sono fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e sfingomielina (SM) [Kramer et al., 2002]. In risposta al trattamento non sono state osservate significative variazioni dei loro quantitativi né al tempo R 1h né dopo 24 ore di ripristino post-OGD (figura 11).

Diversamente da quanto descritto, in letteratura, è stata dimostrata, in differenti modelli sperimentali sottoposti a condizioni ischemiche, una significativa riduzione dei livelli di PL in seguito all'attivazione delle fosfolipasi ed il conseguente rilascio di acidi grassi (AG) nel citoplasma è stato associato al processo infiammatorio e alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [Keleshian et al., 2013; Gentile et al., 2012; Schonfeld et al., 2011; Ramirez et al., 2003; Michiels et al., 2002; Rao et al., 2000; Nakano et al., 1990].

Nel nostro modello cellulare, in accordo con la ripresa proliferativa osservata al tempo R 24h, la privazione di ossigeno e glucosio non sembra rappresentare un evento citotossico tale da innescare la degradazione dei PL. È tuttavia importante evidenziare che sono state rilevate piccole fluttuazioni nei livelli reciproci di PC, PE e SM in ciascun campione, anche se non è stato possibile individuare uno specifico andamento per nessuno di essi. Queste osservazioni potrebbero, quindi, indicare un'iniziale parziale modificazione dell'omeostasi dei PL indotta dall'insulto ischemico, che non sembra tuttavia promuovere un'alterazione irreversibile.

La valutazione dei GG delle cellule RBE4 ha permesso di identificare nel GM2 e nel GM3 quelli maggiormente espressi. È stato inoltre osservato che il trattamento OGD riduce significativamente i loro quantitativi (20%) dopo 1 ora di ripristino delle condizioni normossiche e normoglicidiche, che tornano paragonabili al controllo al tempo R 24h (figura 12A). La diminuzione dei livelli di GG dopo 1 ora di ripristino post-OGD è confermato dal dosaggio di acido sialico associato ai lipidi (figura 12B).

Apparentemente in contrasto con le evidenze sperimentali sopra riportate, nell'encefalo di ratti sottoposti ad occlusione dell'arteria cerebrale, è stato dimostrato l'aumento dei livelli di GM2 e GM3 nell'area cerebrale perinfartuata [Whitehead et al., 2011]. È però necessario tenere in considerazione che a livello neuronale il GG maggiormente espresso in membrana è il GM1 e, quindi, l'aumento dei suoi precursori biosintetici potrebbe significare una diminuzione dei suoi livelli per effetto della sua alterata omeostasi. In cellule neuronali ippocampali alterazioni dei livelli di GM2 e GM3 correlano, inoltre, con la comparsa di disturbi nei processi di mielinogenesi e sinaptogenesi [Whitehead et al., 2011; Ramirez et al., 2003].

Viceversa, in cellule endoteliali cerebrali il GM3 svolge un importante ruolo nel mantenimento delle loro proprietà di barriera [Kanda et al., 1993]. Pertanto l'osservazione del ritorno a livelli basali dei GG, in particolare di GM3, al tempo R 24h è particolarmente interessante. Possiamo infatti ipotizzare che, durante il ripristino post-OGD, le cellule RBE4 non solo mostrino una ripresa proliferativa, ma tentino anche di ristabilire gli equilibri fisiologici e funzionali alterati dalla privazione di ossigeno e glucosio.

Relativamente la valutazione della quota di CL presente nelle membrane di cellule RBE4 sottoposte alle medesime condizioni sperimentali, la figura 13 mostra un aumento significativo dei suoi livelli al tempo R 1h (20%) che si mantengono più elevati rispetto ai valori del controllo fino all'R 24h (10%).

Sebbene in cellule muscolari lisce dell'aorta di coniglio, cresciute in presenza di siero proveniente da un animale ipercolesterolemico sia stato già dimostrato l'accumulo di CL indotto da condizioni ipossiche [Tsukitani et al., 1984], il suo incremento in membrana al tempo R 1h nelle nostre condizioni sperimentali si è rivelato un dato inatteso. È noto, infatti, che una ridotta disponibilità energetica inibisce l'attività enzimatica degli enzimi chiave della biosintesi di CL [Espenshade and Hughes, 2007; Nguyen et al., 2007].

In cellula il colesterolo è presente non solo in forma libera a livello delle membrane, ma anche esterificato (CE) sotto forma di goccioline (droplets) lipidiche nel citoplasma [Verstergaard et al., 2010; Chang et al., 2006]. Poiché le due componenti sono fisiologicamente in equilibrio [Di Paolo and Kim, 2011; Chang et al., 2006] e dal momento che le condizioni ischemiche inibiscono l'attività dell'enzima acil-CoA colesterolo aciltransferasi (ACAT1) [Smith et al., 1989], l'enzima che sintetizza gli esteri del colesterolo, è plausibile ipotizzare che l'aumento di CL indotto dalla privazione di ossigeno e glucosio sia dovuto all'idrolisi della quota di CE.

In accordo con la nostra tesi, la valutazione dei livelli di CL e CE condotta nell'omogenato di cellule RBE4 mostra una significativa redistribuzione delle due componenti di colesterolo al tempo R 1h: infatti, i livelli di CE diminuiscono e parallelamente aumentano quelli di CL. Dopo 24 ore di ripristino post-OGD, i quantitativi reciproci delle due componenti tornano simili al controllo (figura 14).

La composizione lipidica ed in particolare i livelli di CL in membrana sono strettamente correlati alla fluidità di membrana, ovvero al grado di libertà di movimento delle molecole nel doppio strato fosfolipidico [Patel and Insel, 2009], che potrebbe quindi essere influenzata dalle variazioni lipidiche osservate.

Per analizzare l'effetto delle condizioni ischemiche sulla fluidità di membrana, è stata determinata l'anisotropia di fluorescenza della molecola 1,6-difenil-1,3,5-esatriene (DPH). Questo parametro

indica la libertà di movimento della sonda nel doppio strato fosfolipidico ed è inversamente proporzionale alla fluidità di membrana [Grebowski et al., 2013; Schroeder et al., 1994]. Il grafico in figura 15 mostra che l'anisotropia di fluorescenza aumenta significativamente all'R 1h e diminuisce nel corso delle 24 ore di ripristino post-OGD, fino a tornare paragonabile ai valori del controllo.

Il trattamento OGD promuove quindi una diminuzione della fluidità di membrana che correla con le modificazioni dei livelli lipidici riportati ed che è ulteriormente confermata dall'aumento del rapporto tra i quantitativi di CL e fosforo fosfolipidico (CL/P_i) e dal rapporto tra i livelli di FL e proteine di membrana (FL/proteine) (dati non mostrati). Entrambi questi indici, come l'anisotropia di fluorescenza, sono infatti inversamente proporzionali alla fluidità di membrana [Gleason et al., 1991; North and Fleischer, 1983].

Come già affermato, la composizione di membrana partecipa alla modulazione dell'attività catalitica di enzimi tra cui la β -secretasi (BACE1), coinvolta nella tappa fondamentale per la generazione del peptide amiloide [Morris et al., 2013; Rodrigo et al., 2013; Sathya et al., 2012; Zhang et al., 2011; Di Paolo and Kim, 2011; Vestergaard et al., 2010; Patel and Insel, 2009]. In particolare è noto che i livelli di CL in membrana modulano l'attività di BACE1, infatti l'aggiunta di CL in un sistema *in vitro* di vescicole lipoproteiche promuove l'attività della secretasi [Kalvodova et al., 2005] che, al contrario, è inibita da trattamenti volti a depletare le membrane cellulari di CL [Vance, 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Vetrivel and Thinkaran, 2010].

L'incremento della quota di CL in membrana promossa dalle condizioni ischemiche in cellule RBE4, potrebbe quindi partecipare all'induzione della sintesi di A β ₄₂ precedentemente dimostrata nelle medesime condizioni sperimentali da Bulbarelli e collaboratori (2012).

Abbiamo pertanto saggiato l'attività di BACE1 e valutato i livelli di espressione delle proteine APP e BACE1 nelle MEF di cellule RBE4 sottoposte ad OGD. In accordo con quanto atteso, l'attività di BACE1 aumenta significativamente (circa 45%) in risposta alla deprivazione di ossigeno e glucosio e, dato più interessante, la sua attivazione persiste fino a 24 ore di ripristino post-OGD (30%) (figura 16A). È stato inoltre confermato l'incremento transiente (90%) dei livelli proteici di BACE1 al tempo R 1h e l'aumento del suo substrato fino a 24 ore di ripristino (75%), (figura 16B), precedentemente osservato nell'omogenato totale [Bulbarelli et al., 2012]. L'attivazione di BACE1 che si protrae fino a 24 ore di ripristino post-OGD sembrerebbe quindi dipendere non solo dagli aumentati livelli di espressione della proteina, ma anche dalle variazioni lipidiche promosse dalle condizioni ischemiche. L'induzione enzimatica della β -secretasi osservata potrebbe contribuire significativamente ad alterare il fisiologico equilibrio tra il processamento non amiloidogenico e

quello amiloidogenico [Zhang et al., 2011; Di Paolo and Kim, 2011; Vestergaard et al., 2010] favorendo la produzione di $A\beta_{42}$.

Sulla base di recenti dati di letteratura, una consistente quota di BACE1 sembra risiedere nei lipid rafts di membrana [Sathya et al., 2012; Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011] e, sebbene non vi sia completo accordo nella comunità scientifica, è generalmente accettato che il processamento amiloidogenico di APP sia un evento localizzato preferenzialmente nei microdomini arricchiti in CL [Sathya et al., 2012; Maulik et al., 2012; Di Paolo and Kim, 2011; Vestergaard et al., 2010; Taylor and Hooper, 2007].

Abbiamo quindi valutato l'attività della β -secretasi in frazioni di membrana TRITON X-100 solubili (TS), corrispondenti alle porzioni non rafts, e TRITON X-100 insolubili (TI), che comprendono i microdomini, dopo 1 e 24 ore di ripristino della normossia e normoglicemia. Il trattamento a freddo con TRITON X-100, un detergente non ionico, solubilizza infatti le porzioni di membrana che non presentano la specifica composizione dei lipid rafts e permette la loro distinzione [Patel and Insel, 2009].

Differentemente da quanto atteso, il rapporto dell'attività di BACE1 in frazioni TI rispetto a quello in frazioni TS (rapporto TI/TS) si riduce significativamente del 50% rispetto alle condizioni controllo, fino a 24 ore di ripristino post-OGD (figura 17A).

Inaspettatamente, quindi, i dati ottenuti in cellule RBE4 indicano, in risposta al trattamento, un aumento di attività della β -secretasi prevalentemente in porzioni di membrana non contenenti lipid rafts.

Nel tentativo di confermare il dato osservato, abbiamo indagato la localizzazione della proteina BACE1 e di APP nelle porzioni TS e TI di membrana. Comprendere in quali porzioni di membrana si distribuiscano tali proteine, in seguito all'aumento dei loro livelli, potrebbe infatti fornire dati a conferma dell'inaspettato incremento di attività della β -secretasi in regioni non rafts.

Durante il ripristino post-OGD, i livelli proteici di APP e BACE1 si riducono nelle frazioni TI rispetto alle condizioni controllo, nonostante l'incremento di entrambe le proteine osservato nelle MEF. Più in dettaglio, il rapporto TI/TS dei livelli proteici di BACE1 diminuisce in modo significativo all'R 1h (50%) e quello della proteina APP in modo tempo dipendente fino all'R 24h (55%) (figura 17B).

La riduzione dei livelli proteici di APP e BACE1 in frazioni TI di membrana supporta quindi l'evidenza di una maggior attività della secretasi nelle frazioni TS e correla con l'aumentata produzione di $A\beta_{42}$ indotta dal trattamento OGD in cellule RBE4 [Bulbarelli et al., 2012].

È stato inoltre recentemente dimostrato che l'attività catalitica di BACE1 non richiede una specifica localizzazione della secretasi all'interno dei lipid rafts. Infatti non sono state riscontrate

significative variazioni nelle quantità di $A\beta_{42}$ prodotto in cellule esprimenti BACE1 wild type e in cellule esprimenti una forma mutata della secretasi che non localizza nei lipid rafts [Vetrivel et al., 2009].

Nonostante numerosi lavori supportino l'ipotesi che la produzione di $A\beta_{42}$ sia associata ai lipid rafts, sono state fornite evidenze sperimentali che propongono, in alternativa, che il processamento amiloidogenico di APP avvenga all'esterno di essi e che sia favorito da eventi molecolari che promuovono la fuoriuscita di BACE1 dai microdomini arricchiti in colesterolo e sfingolipidi [Taylor and Hooper, 2007].

Nell'ipotesi che il taglio amiloidogenico di APP mediato da BACE1 avvenga all'esterno dei lipid rafts, ci è sembrata particolarmente interessante l'osservazione che variazioni dei livelli di CL possano essere coinvolte nello spostamento di BACE1 al di fuori dei microdomini di membrana [Taylor and Hooper, 2007; Abad-Rodriguez et al., 2004].

Sebbene in neuroni ippocampali sia stato riportato che una lieve riduzione di CL, alterando la struttura dei lipid rafts, promuove la sintesi di peptide amiloide [Abad-Rodrigues et al., 2004], in cellule RBE4 sottoposte ad OGD, sembra, al contrario, che essa sia indotta dall'aumento di CL in membrana.

Differentemente da quanto riportato da Abad-Rodrigues e collaboratori (2004), infatti, la variazione dei livelli di CL, indotta dal trattamento, non sembra modificare il numero di lipid rafts nel modello sperimentale in esame. Inoltre, il significativo aumento livelli di CL sia in frazioni TS sia in frazioni TI di membrana, non mostrando un sito preferenziale di accumulo, suggerisce che la sua distribuzione non dipenda da un meccanismo regolato. Infatti, come mostrato nel grafico in figura 18, il rapporto tra i livelli di CL nelle frazioni TI e quelli nelle frazioni TS (rapporto TI/TS) non varia rispetto al controllo. Se, al contrario, l'incremento di CL, fosse volto all'aumento del numero di lipid rafts ci aspetteremmo di osservare un parallelo aumento dei livelli di GG, richiesti per la formazione di nuovi microdomini [Ohmi et al., 2012; Sonnino et al., 2006].

I dati sinora riportati indicano quindi che, in frazioni TS di membrana, gli aumentati livelli di CL sono sufficienti a promuovere l'attivazione della β -secretasi [Kalvodova et al., 2005], e forniscono interessanti informazioni per formulare nuove ipotesi circa i meccanismi molecolari coinvolti nella produzione di $A\beta_{42}$ [Bulbarelli et al., 2012].

L'ipotesi vascolare proposta per chiarire l'eziologia dell'AD sostiene che la deposizione di peptide amiloide nel parenchima cerebrale (e la conseguente attivazione degli eventi neurodegenerativi) sia un evento citotossico secondario, causato da un danno vascolare pregresso. I meccanismi molecolari attivati dalle cellule della BEE in risposta a tali insulti, potrebbero quindi svolgere un ruolo primario nella patogenesi della malattia [Pluta et al., 2013; Sagare et al., 2012; Kalaria et al., 2012; Jeynes

and Provias, 2011; Altman and Ruthledge, 2010; Iadecola, 2010; Bell and Zlokovic, 2009; Iadecola, 2004; Zlokovic, 2002]. Infatti, gli episodi ischemici promuovono la produzione e l'accumulo di $A\beta_{42}$ a livello endoteliale e nel lume di vasi cerebrali, e la tossicità che ne deriverebbe [Grinberg et al., 2012; Patel et al., 2010; Cantara et al., 2007] potrebbe causare un'ulteriore perdita di funzionalità degli elementi vascolari già danneggiati dall'ischemia [Lakhan et al., 2013]. Le conseguenti alterazioni a livello di BEE potrebbero rallentare l'eliminazione del peptide dall'encefalo o facilitarne l'influsso dalla periferia, fino alla patologica deposizione delle placche senili e alla degenerazione neuronale [Sagare et al., 2012; Kalaria et al., 2012; Jaynes and Provias, 2011; Altman and Ruthledge, 2010; Iadecola, 2010; Bell and Zlokovic, 2009]. Inoltre, l'indebolimento strutturale a carico della BEE potrebbe contribuire, in un circolo vizioso, al verificarsi di successivi eventi ischemici [Grinberg et al., 2012; Popescu et al., 2009; Jellinger et al., 2007], esasperando le variazioni lipidiche e i meccanismi molecolari sopra descritti e aggravando le condizioni del distretto vascolare cerebrale.

Dati i risvolti fisiopatologici dell'aumento della quota di CL in membrana, che, come detto in precedenza, sembra dipendere dalla diminuzione dei livelli di CE presenti in cellula (figura 13), ci siamo domandati quale possa essere il significato fisiologico del rilascio in cellula di AG e CL in risposta alle condizioni ischemiche. Infatti, sebbene gli AG liberi siano generalmente utilizzati nella β -ossidazione a scopo energetico, questo processo è inibito in mancanza di ossigeno [Nelson and Cox, 2008].

Recentemente, è stata dimostrata una correlazione tra il destino metabolico degli AG derivanti dall'idrolisi del CE e i FL di membrana: in seguito ad idrolisi del CE, infatti, gli AG possono essere nuovamente esterificati per costituire FL di membrana [Hutchins and Murphy, 2012].

L'induzione di un simile meccanismo in risposta al trattamento OGD, nel nostro modello cellulare, potrebbe rappresentare un'interessante via per il riciclo funzionale delle componenti cellulari potenzialmente danneggiate dall'OGD. Infatti, le condizioni ischemiche promuovono il rilascio di acido arachidonico (AA) dai FL di membrana in seguito all'attivazione della fosfolipasi A_2 citosolica ($cPLA_2$) [Keleshian et al., 2013; Gentile et al., 2012; Schonfeld et al., 2011; Ramirez et al., 2003; Rao et al., 2000]. L'AA è un AG polinsaturo a 20 atomi di carbonio ($C_{20:4}$) e il suo metabolismo è strettamente associato alla risposta infiammatoria: in seguito alla sua liberazione dai FL, infatti, l'AA può essere convertito in leucotrieni, prostaglandine e trombossani, molecole segnale fondamentali per il processo infiammatorio. In particolare, l'enzima inducibile cicloossigenasi 2 (COX2) catalizza la prima delle reazioni che porta alla biosintesi delle prostaglandine coinvolte nel processo di vasodilatazione, o dei trombossani, che promuovono

vasocostrizione [Gentile et al., 2012; Rao et al., 2012; Kim et al., 2011; Fraser, 2011; Mbonye and Song, 2009].

Abbiamo, pertanto, ipotizzato che una simile cascata metabolica si attivi anche nel nostro modello *in vitro* di ischemia e, al fine di verificare tale ipotesi, sono stati valutati i livelli di espressione delle proteine COX2 e cPLA₂. Quest'ultima è stata analizzata nelle frazioni arricchite in membrana poiché tale localizzazione è un requisito indispensabile per l'attivazione dell'enzima [Gentile et al., 2012].

In cellule RBE4, le condizioni ischemiche promuovono l'aumento significativo (40%) dei livelli proteici di cPLA₂ nelle MEF (figura 19A) e di COX2 in modo tempo dipendente (80% al tempo R 1h e 260% al tempo R 24h) (figura 19B). Queste evidenze sperimentali sembrerebbero, quindi, indicare che la deprivazione di ossigeno e glucosio promuove il rilascio di AG, e in particolare AA, dai FL di membrana.

I dati sopra riportati sembrano in contrasto con l'osservazione che i livelli di FL dopo trattamento OGD si mantengono paragonabili a quelli del controllo (figura 11); in realtà, ci permettono di proporre un'interessante interpretazione fisiologica per la riduzione della quota di CE osservata al tempo R 1h (figura 13). Gli AG liberi che deriverebbero dall'idrolisi di CE potrebbero, infatti, essere riutilizzati in cellula allo scopo di compensare la perdita delle catene aciliche dei FL, mediata dall'attivazione dell'enzima cPLA₂, e di limitare il danno strutturale a carico delle membrane. Le fluttuazioni dei livelli reciproci di PC, PE e SM osservate in cellule RBE4 potrebbero indicare che questo meccanismo, pur risultando efficace in risposta al trattamento OGD da noi effettuato, potrebbe, come già riportato, risultare parziale o addirittura insufficiente in cellule differenti o in caso di condizioni ischemiche più severe per intensità e/o durata [Keleshian et al., 2013; Gentile et al., 2012; Schonfeld et al., 2011; Ramirez et al., 2003; Rao et al., 2000]. Inoltre, l'idea che l'endotelio di BEE si mobiliti nel tentativo di preservare la propria struttura di membrana è in accordo con l'importanza del ruolo dell'organizzazione lipidica nel mantenimento delle sue proprietà di barriera.

In accordo con la nostra ipotesi, l'aumento di CL, e la conseguente rigidità di membrana, in risposta a condizioni ischemiche, costituirebbero, quindi, una sorta di inevitabile "effetto collaterale". Fisiologicamente, infatti, l'eccesso di CL viene indirizzato alle membrane, preferenzialmente alla membrana plasmatica, per favorire il suo efflusso ed evitare che si accumuli nel citoplasma [Verstergaard et al., 2010; Chang et al., 2006].

L'induzione di questo processo compensatorio, pur necessitando ulteriori studi, potrebbe inoltre contribuire a chiarire, i meccanismi molecolari alla base della correlazione patologica tra l'evento ischemico e l'aumento della produzione di A β ₄₂ in cellule di endotelio cerebrale [Bulbarelli et al.,

2012]. L'incremento dei livelli di CL, dovuti all'idrolisi di CE, sebbene abbia inizialmente un significato protettivo, potrebbe, in realtà, contribuire all'attivazione della secretasi BACE1 e alla conseguente produzione di A β ₄₂. Inoltre, nel tempo l'accumulo di peptide amiloide, alterando gli elementi endoteliali vascolari, potrebbe provocare un più generale indebolimento strutturale della BEE [Grinberg et al., 2012; Patel et al., 2010; Cantara et al., 2007] e, in seguito a ripetuti episodi ischemici, comportare disfunzioni sempre più gravi ed estese in grado di compromettere l'omeostasi dell'encefalo [Sagare et al., 2012; Kalaria et al., 2012].

L'incapacità della barriera di eliminare dal SNC gli eccessi di peptide amiloide ed il suo conseguente accumulo nel distretto neuronale/vascolare [Sagare et al., 2012; Kalaria et al., 2012; Jaynes and Provias, 2011; Iadecola, 2010; Bell and Zlokovic, 2009], oltre a uno stato generale di stress ossidativo, infiammazione cronica e attivazione microgliale [Keleshian et al., 2013; Gentile et al., 2012; Heneka et al., 2010; Ogunshola and Antoniou, 2009] sono fattori che concorrono ai processi neurodegenerativi che caratterizzano l'AD.

BIBLIOGRAFIA

Abad-Rodriguez J., Ledesma M.D., Craessaerts K., Perga S., Medina M., Delacourte A., Dingwall C., De Strooper B., Dotti C.G. (2004) *Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation* J Cell Biol 167: 953-60.

Abbott N.J., Friedman A. (2012) *Overview and introduction: The blood–brain barrier in health and disease* Epilepsia 53: 1-6.

Abrahams P.H., Day A., Allt G. (1980) *Schwann cell plasma membrane changes induced by nerve crush. A freeze-fracture study* Acta Neuropathol 50: 85-90.

Adibhatla R.M., Dempsey R., Hatcher J.F. (2008) *Integration of cytokine biology and lipid metabolism in stroke* Front Biosci 13: 1250-70.

Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J. (2001) *Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia* Stroke 32: 2376-81.

Adibhatla R.M., Hatcher J.F. (2008) *Role of Lipids in Brain Injury and Diseases* Future Lipidol 2: 403-422.

Algotsson A., Winblad B. (2007) *The integrity of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease* Acta Neurol Scand 115: 403-8.

Allan L.M., Rowan E.N., Firbank M.J., Thomas A.J., Parry S.W., Polvikoski T.M., O'Brien J.T., Kalaria R.N. (2011) *Long term incidence of dementia, predictors of mortality and pathological diagnosis in older stroke survivors* Brain 134: 3716-27.

Altman R., Rutledge J.C. (2010) *The vascular contribution to Alzheimer's disease* Clin Sci (Lond) 119: 407-21.

An P., Xue Y.X. (2009) *Effects of preconditioning on tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells* Brain Res. 1272: 81-8.

- Anderton B.H. (2002) *Aging of the brain* Mechanisms of ageing and development 123: 811-817.
- Araújo J.R., Gonçalves P., Martel F. (2010) *Characterization of uptake of folates by rat and human blood-brain barrier endothelial cells* Biofactors 36: 201-9.
- Ariga T., McDonald M.P., Yu R.K. (2008) *Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review* J Lipid Res 49: 1157-75.
- Armulik A., Genovè G., Mae M., Nisancioglu M.H., Wallgard E., Niaudet C., He L., Norlin J., Lindblom P., Strittmatter K., Johansson B.R., Betsholtz C. (2010) *Pericytes regulate the blood-brain barrier* Nature 468: 557-561.
- Balbuena P., Li W., Ehrich M. (2011) *Assessments of tight junction proteins occludin, claudin 5 and scaffold proteins ZO1 and ZO2 in endothelial cells of the rat blood-brain barrier: cellular responses to neurotoxicants malathion and lead acetate* Neurotoxicology 32: 58-67.
- Ballabh P., Braun A., Nedergaard M., (2004) *The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications* Neurobiology of Disease 16: 1-13.
- Bartlett G.R. (1959) *Phosphorus assay in column chromatography* J Biol Chem 234: 466-8.
- Bazan N.G., Palacios-Pelaez R. (2002) *Hypoxia signalling to genes Significance in Alzheimer's Disease* Molecular Neurobiology 26: 283-298.
- Bell R.D., Zlokovic B.V. (2009) *Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease* Acta Neuropathol 118:103-113.
- Benn M. (2009) *Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review* Atherosclerosis 206: 17-30.
- Berman D.E., Dall'Armi C., Voronov S.V., McIntire L.B., Zhang H., Moore A.Z., Staniszewski A., Arancio O., Kim T.W., Di Paolo G. (2008) *Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism* Nat Neurosci 11: 547-54.

- Björkhem I., Meaney S. (2004) *Brain cholesterol: long secret life behind a barrier* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 806-15.
- Borlongan C.V., Rodrigues A.A. Jr, Oliveira M.C. (2012) *Breaking the barrier in stroke: what should we know? A mini-review* *Curr Pharm Des* 18: 3615-23.
- Bu G. (2009) *Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy* *Nat Rev Neurosci* 10: 333-44.
- Bulbarelli A., Lonati E., Brambilla A., Orlando A., Cazzaniga E., Piazza F., Ferrarese C., Masserini M., Sancini G. (2012) *A β 42 production in brain capillary endothelial cells after oxygen and glucose deprivation* *Mol Cell Neurosci* 49: 415-22.
- Cantara S., Thorpe P.E., Ziche M., Donnini S. (2007) *TAT-BH4 counteracts A β toxicity on capillary endothelium* *FEBS Lett* 581: 702-6.
- Chan R.B., Oliveira T.G., Cortes E.P., Honig L.S., Duff K.E., Small S.A., Wenk M.R., Shui G., Di Paolo G. (2012) *Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease* *J Biol Chem* 287: 2678-88.
- Chang T-Y., Chang C.C.Y., Ohgami N., Yamauchi Y. (2006) *Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification* *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 129-57.
- Chauhan N.B. (2003) *Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease* *J Lipid Res* 44: 2019-2029.
- Chen J.H., Lin K.P., Chen Y.C. (2009) *Risk factors for dementia* *J Formos Med Assoc* 108: 754-64.
- Clayson S., Cochet M., Donneger R., Dumuis A., Bockaert J., Giannoni P. (2012) *Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay* *Cell Signal* 24: 1831-40.
- Cooper G.M., Hausman R.E. (2009) *The Cell: A Molecular Approach* Sinauer Associates.

Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. (1993) *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families* Science 261: 921-3.

D'Angelo G., Capasso S., Sticco L., Russo D. (2013) *Glycosphingolipids: synthesis and functions* FEBS J [Epub ahead of print].

Daneman R., Agalliu D., Zhou L., Kuhnert F., Kuo C.J., Barres B.A. (2009) *Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis* Proc Natl Acad Sci USA 106: 641-646.

Daneman R., Zhou L., Kebede A.A., Barres B.A. (2010) *Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis* Nature 468: 562-566.

De Felice F.G., Wu D., Lambert M.P., Fernandez S.J., Velasco P.T., Lacor P.N., Bigio E.H., Jerecic J., Acton P.J., Shughrue P.J., Chen-Dodson E., Kinney G.G., Klein W.L. (2008) *Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers* Neurobiology of Aging 29: 1334-1347.

de la Torre J.C. (2010) *Vascular risk factor detection and control may prevent Alzheimer's disease* Ageing Res Rev 9: 218-25.

Deane R., Wu Z., Zlokovic B.V. (2004) *RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier* Stroke 35: 2628-31.

Di Paolo G., Kim T-W. (2011) *Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond* Nature/reviews 12: 284-296.

Dodelet-Devillers A., Cayrol R., van Horssen J., Haqqani A.S., de Vries H.E., Engelhardt B., Greenwood J., Prat A. (2009) *Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier* J Mol Med (Berl) 87: 765-74.

- Donati R.J., Dwivedi Y., Roberts R.C., Conley R.R., Pandey G.N., Rasenick M.M. (2008) *Postmortem brain tissue of depressed suicides reveals increased Gs alpha localization in lipid raft domains where it is less likely to activate adenylyl cyclase* J Neurosci 28: 3042-50.
- Eisele Y.S., Obermüller U., Heilbronner G., Baumann F., Kaeser S.A., Wolburg H., Walker L.C., Staufenbiel M., Heikenwalder M., Jucker M. (2010) *Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis* Science 330: 980-2.
- Elfrink K., Ollesch J., Stöhr J., Willbold D., Riesner D., Gerwert K. (2008) *Structural changes of membrane-anchored native PrP(C)* Proc Natl Acad Sci USA 105: 10815-9.
- Enciu A-M., Gherghiceanu M., Popescu B.O. (2013) *Triggers and Effectors of Oxidative Stress at Blood-Brain Barrier Level: Relevance for Brain Ageing and Neurodegeneration* Oxid Med Cell Longev 2013: 297512.
- Engelhardt B., Coisne C. (2011) *Fluids and barriers of the CNS establish immunoprivilege by confining immune surveillance to a twowalled castle moat surrounding the CNS castle* Fluids Barriers CNS 8:4.
- Ernst A.M., Brügger B. (2013) *Sphingolipids as modulators of membrane proteins* Biochim Biophys Acta [Epub ahead of print].
- Espenshade P.J., Hughes A.L. (2007) *Regulation of sterol synthesis in eukaryotes* Annu Rev Genet 41: 401-27.
- Faria A., Pestana D., Teixeira D., Couraud P.O., Romero I., Weksler B., de Freitas V., Mateus N., Calhau C. (2011) *Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier* Food Funct 2: 39-44.
- Fraser P.A. (2011) *The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability* Free Radic Biol Med 51: 967-77.
- Gagneux P., Varki A. (1999) *Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function* Glycobiology 9: 747-55.

Gangoiti P., Camacho L., Arana L., Ouro A., Granado M.H., Brizuela L., Casas J., Fabriás G., Abad J.L., Delgado A., Gómez-Muñoz A. (2010) *Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease* Prog Lipid Res 49: 316-34.

Gentile M.T., Reccia M.G., Sorrentino P.P., Vitale E., Sorrentino G., Puca A.A., Colucci-D'Amato L. (2012) *Role of cytosolic calcium-dependent phospholipase A2 in Alzheimer's disease pathogenesis* Mol Neurobiol 45: 596-604.

Gleason M.M., Medow M.S., Tulenko T.N. (1991) *Excess membrane cholesterol alters calcium movements, cytosolic calcium levels, and membrane fluidity in arterial smooth muscle cells* Circ Res 69: 216-27.

González S., Fernández O., Fernández R., Menéndez C., Maza J., González-Quevedo A., Buergo M.A. (2008) *Association between Blood Lipids and Types of Stroke* MEDICC Rev 10: 27-32.

Grebowski J., Krokosz A., Puchala M. (2013) *Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene* Biochim Biophys Acta 1828: 241-8.

Greenwood J., Heasman S.J., Alvarez J.I., Prat A., Lyck R., Engelhardt B. (2011) *Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the bloodbrain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain* Neuropathol Appl Neurobiol 37: 24-39.

Grimm M.O., Grimm H.S., Pätzold A.J., Zinser E.G., Halonen R., Duering M., Tschäpe J.A., De Strooper B., Müller U., Shen J., Hartmann T. (2005) *Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin* Nat Cell Biol 7: 1118-23.

Grinberg L.T., Korczyn A.D., Heinsen H. (2012) *Cerebral amyloid angiopathy impact on endothelium* Exp Gerontol 47: 838-842.

Grösgen S., Grimm M.O., Friess P., Hartmann T. (2010) *Role of amyloid beta in lipid homeostasis* Biochim Biophys Acta 1801: 966-74.

Guglielmotto M., Aragno M., Autelli R., Giliberto L., Novo E., Colombatto S., Danni O., Parola M., Smith M.A., Perry G., Tamagno E., Tabaton M., (2009) *The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1 α* Journal of Neurochemistry 108: 1045-1056.

Hawkins B.T., Davis T.P., (2005) *The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease* Pharmacological Reviews 57: 173-185.

Heider J.G., Boyett R.L. (1978) *The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture* J Lipid Res 19: 514-8.

Heneka M.T., O'Banion M.K., Terwel D., Kummer M.P. (2010) *Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease* J Neural Transm 117: 919-47.

Hertz L. (2008) *Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective* Neuropharmacology 55: 289-309.

Hutchins P.M., Murphy R.C. (2012) *Cholesteryl ester acyl oxidation and remodeling in murine macrophages: formation of oxidized phosphatidylcholine* J Lipid Res 53: 1588-97.

Iadecola C. (2010) *The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia* Acta Neuropathol 120: 287-96.

Inaba S., Okada T., Konakahara T., Kodaka M. (2005) *Specific binding of amyloid-beta-protein to IMR-32 neuroblastoma cell membrane* J Pept Res 65: 485-90.

Jabłoński M., Maciejewski R., Januszewski S., ułamek M., pluta R. (2011) *One Year Follow up in Ischemic Brain Injury and the Role of Alzheimer Factors* Physiol. Res 60: S113-S119.

Jalbert J.J., Daiello L.A., Lapane K.L. (2008) *Dementia of the Alzheimer Type* Epidemiol Rev 30: 15-34.

Janfelt C., Wellner N., Leger P.L., Kokesch-Himmelreich J., Hansen S.H., Charriaut-Marlangue C., Hansen H.S. (2012) *Visualization by mass spectrometry of 2-dimensional changes in rat brain*

lipids, including *N*-acylphosphatidylethanolamines, during neonatal brain ischemia *FASEB J* 26: 2667-73.

Jellinger K.A. (2010) *Prevalence and impact of cerebrovascular lesions in Alzheimer and lewy body diseases* *Neurodegener Dis* 7: 112-5.

Jellinger K.A., Lauda, F., Attems, J. (2007) *Sporadic cerebral amyloid angiopathy is not a frequent cause of spontaneous brain hemorrhage* *Eur. J. Neurol* 14; 923-928.

Jeynes B., Provias J. (2011) *The case for blood-brain barrier dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease* *J Neurosci Res* 89: 22-8.

Jin L.W., Shie F.S., Maezawa I., Vincent I., Bird T. (2004) *Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities* *Am J Pathol* 164: 975-85.

Kalaria R.N., Akinyemi R., Ihara M. (2012) *Does vascular pathology contribute to Alzheimer changes?* *J Neurol Sci* 322: 141-147.

Kalaria R.N. (2010) *Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia* *Nutr Rev* 68: S74-87.

Kalaria R.N., Ballard C. (1999) *Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia* *Alzheimer Dis Assoc Disord* 13: S115-23.

Kalvodova L., Kahya N., Schwille P., Eehalt R., Verkade P., Drechsel D., Simons K. (2005) *Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro* *J Biol Chem* 280: 36815-23.

Kanda T., Ariga T., Yamawaki M., Yu R.K. (1993) *GM3 regulates protein kinase systems in cultured brain microvascular endothelial cells* *J Neurochem* 61: 1969-72.

- Keleshian V.L., Modi H.R., Rapoport S.I., Rao J.S. (2013) *Aging is associated with altered inflammatory, arachidonic acid cascade, and synaptic markers, influenced by epigenetic modifications, in the human frontal cortex* J Neurochem 125: 63-73.
- Kim H.W., Rapoport S.I., Rao J.S. (2011) *Altered arachidonic acid cascade enzymes in postmortem brain from bipolar disorder patients* Mol Psychiatry 16: 419-28.
- Kimura N., Yanagisawa K. (2007) *Endosomal accumulation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein in neurons of aged monkey brains* Neuroreport 18: 1669-73.
- Knopman D.S., Roberts R. (2010) *Vascular risk factors: imaging and neuropathologic correlates* J Alzheimers Dis 20: 699-709.
- Kodam A., Maulik M., Peake K., Amritraj A., Vetrivel K.S., Thinakaran G., Vance J.E., Kar S. (2010) *Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains* Glia 58: 1267-81.
- Koh Y.H., von Arnim C.A.F., Hyman B.T., tanza R.E., Tesco G., (2005) *BACE is degraded via the lysosomal pathway* The Journal of Biological Chemistry 280: 32499-32504.
- Koike M.A., Green K.N., Blurton-Jones M., Laferla F.M. (2010) *Oligemic hypoperfusion differentially affects tau and amyloid- β* Am J Pathol 177: 300-10.
- Kojro E., Gimpl G., Lammich S., Marz W., Fahrenholz F. (2001) *Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10* Proc Natl Acad Sci USA 98: 5815-20.
- Koldamova R., Staufenbiel M., Lefterov I. (2005) *Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice* J Biol Chem 280: 43224-35.
- Koto T., Takubo K., Ishida S., Shinoda H., Inoue M., Tsubota K., Okada Y., Ikeda E. (2007) *Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells* Am J Pathol 170: 1389-97.

Kramer S.D, Hurley J.A., Abbott N.J., Begley D.J. (2002) *Lipids in blood-brain barrier models in vitro I: thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography for the analysis of lipid classes and long-chain polyunsaturated fatty acids* In Vitro Cell. Dev. Biol.- Animal 38: 5575-65.

Kriem B., Sponne I., Fifre A., Malaplate-Armand C., Lozac'h-Pillot K., Koziel V., Yen-Potin F.T., Bihain B., Oster T., Olivier J.L., Pillot T. (2005) *Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide* FASEB J 19: 85-7.

Kwak D.H., Kim S.M., Lee D.H., Kim J.S., Kim S.M., Lee S.U., Jung K.Y., Seo B.B., Choo Y.K. (2005) *Differential expression patterns of gangliosides in the ischemic cerebral cortex produced by middle cerebral artery occlusion* Mol Cells 20: 354-60.

Lajoie P., Nabi I.R. (2007) *Regulation of raft-dependent endocytosis* J Cell Mol Med 11: 644-53.

Lakhan S.E., Kirchgessner A., Tepper D., Leonard A. (2013) *Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke* Front Neurol 4: 32.

Landman N., Jeong S.Y., Shin S.Y., Voronov S.V., Serban G., Kang M.S., Park M.K., Di Paolo G., Chung S., Kim T.W. (2006) *Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease cause an imbalance in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism* Proc Natl Acad Sci USA 103: 19524-9.

Ledesma M.D., Abad-Rodriguez J., Galvan C., Biondi E., Navarro P., Delacourte A., Dingwall C., Dotti C.G. (2003) *Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains* EMBO Rep 4: 1190-6.

Lesné S., Kotilinek L., Ashe K.H. (2008) *Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function* Neurosci 151: 745-9.

Lewis H., Beher D., Cookson N., Oakley A., Piggott M., Morris C.M., Jaros E., Perry R., Ince P., Kenny R.A., Ballard C.G., Shearman M.S., Kalaria R.N. (2006) *Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: age-related accumulation of amyloid-beta(42) peptide in vascular dementia* Neuropathol Appl Neurobiol 32: 103-18.

Liebner S., Corada M., Bangsow T., Babbage J., Taddei A., Czupalla C.J., Reis M., Felici A., Wolburg H., Fruttiger M., Taketo M.M., von Melchner H., Plate K.H., Gerhardt H., Dejana E. (2008) *Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier* J Cell Biol 183: 409-417.

Lin H.W., Perez-Pinzon M. (2013) *The role of fatty acids in the regulation of cerebral vascular function and neuroprotection in ischemia* CNS Neurol Disord Drug Targets 12: 316-24.

Lingwood D., Simons K. (2010) *Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle* Science 327: 46-50.

Malaplate-Armand C., Florent-Bécharde S., Youssef I., Koziel V., Sponne I., Kriem B., Leininger-Muller B., Olivier J.L., Oster T., Pillot T. (2006) *Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway* Neurobiol Dis 23: 178-89.

Marquer C., Devauges V., Cossec J.C., Liot G., Lécart S., Saudou F., Duyckaerts C., Lévêque-Fort S., Potier M.C. (2011) *Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis* FASEB J 25: 1295-305.

Martins I.C., Kuperstein I., Wilkinson H., Maes E., Vanbrabant M., Jonckheere W., Van Gelder P., Hartmann D., D'Hooge R., De Strooper B., Schymkowitz J., Rousseau F. (2008) *Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice* EMBO J 27: 224-33.

Maulik M., Westaway D., Jhamandas J.H., Kar S. (2012) *Role of Cholesterol in APP Metabolism and Its Significance in Alzheimer's Disease Pathogenesis* Mol Neurobiol 47: 37-63.

Mayeux R., Stern Y. (2012) *Epidemiology of Alzheimer disease* Cold Spring Harb Perspect Med 2(8).

Mbonye U.R., Song I. (2009) *Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression* BMB Rep 42: 552-60.

- McCaffrey G., Staats W.D., Quigley C.A., Nametz N., Seelbach M.J., Campos C.R., Brooks T.A., Eggleton R.D., Davis T.P. (2007) *Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity in vivo* J Neurochem 103: 2540-55.
- McLeod L.L., Sevanian A. (1997) *Lipid peroxidation and modification of lipid composition in an endothelial cell model of ischemia and reperfusion* Free Radic Biol Med 23: 680-94.
- Michiels C., Renard P., Bouaziz N., Heck N., Eliaers F., Ninane N., Quarck R., Holvoet P., Raes M. (2002) *Identification of the phospholipase A(2) isoforms that contribute to arachidonic acid release in hypoxic endothelial cells: limits of phospholipase A(2) inhibitors* Biochem Pharmacol 63: 321-32.
- Molander-Melin M., Blennow K., Bogdanovic N., Dellheden B., Månsson J.E., Fredman P. (2005) *Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains* J Neurochem 92: 171-82.
- Morris E.M., Jackman M.R., Meers G.M., Johnson G.C., Lopez J.L., Maclean P.S., Thyfault J.P. (2013) *Reduced Hepatic Mitochondrial Respiration following acute High-fat Diet is Prevented by PGC-1 α Overexpression* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol [Epub ahead of print].
- Nakano S., Kogure K., Abe K., Yae T. (1990) *Ischemia-induced alterations in lipid metabolism of the gerbil cerebral cortex: I. changes in free fatty acid liberation* J Neurochem 54: 1911-6.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2008) *The principles of biochemistry Lehninger* W.H. Freeman and Company.
- Nguyen A.D., McDonald J.G., Bruick R.K., DeBose-Boyd R.A. (2007) *Hypoxia stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase through accumulation of lanosterol and hypoxia-inducible factor-mediated induction of insigs* J Biol Chem 282: 27436-46.
- Nicolson G.L., Singer S.J. (1972) *Electron microscopic localization of macromolecules on membrane surfaces* Ann N Y Acad Sci 195: 368-75.

- North P., Fleischer S. (1983) *Alteration of synaptic membrane cholesterol/phospholipid ratio using a lipid transfer protein. Effect on gamma-aminobutyric acid uptake* J Biol Chem 258: 1242-53.
- Oguchi K., Tsukagoshi H. (1980) *An electron-microscopic study of the T-system in progressive muscular dystrophy (Duchenne) using lanthanum* J Neurol Sci 44: 161-168.
- Ogunshola O.O., Antoniou X. (2009) *Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1alpha a mediator of neurodegeneration?* Cell Mol Life Sci 66: 3555-63.
- Ohmi Y., Ohkawa Y., Yamauchi Y., Tajima O., Furukawa K., Furukawa K. (2012) *Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues* Neurochem Res 37: 1185-91.
- Oliveira T.G., Chan R.B., Tian H., Laredo M., Shui G., Staniszewski A., Zhang H., Wang L., Kim T.W., Duff K.E., Wenk M.R., Arancio O., Di Paolo G. (2010) *Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits* J Neurosci 30: 16419-28.
- Oliveira T.G., Di Paolo G. (2010) *Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease* Biochim Biophys Acta 1801: 799-805.
- Osenkowski P., Ye W., Wang R., Wolfe M.S., Selkoe D.J. (2008) *Direct and potent regulation of gamma-secretase by its lipid microenvironment* J Biol Chem 283: 22529-40.
- Palade G. (1953) *Fine structure of blood capillaries* J Appl Phys 24: 1424.
- Parsons R.B., Austen B.M. (2005) *Protein lipidation of BACE* Biochem Soc Trans 33: 1091-3.
- Patel N.S., Mathura V.S., Bachmeier C., Beaulieu-Abdelahad D., Laporte V., Weeks O., Mullan M., Paris D. (2010) *Alzheimer's beta-amyloid peptide blocks vascular endothelial growth factor mediated signaling via direct interaction with VEGFR-2* J Neurochem 112: 66-76.
- Patel H.H., Insel P.A. (2009) *Lipid Rafts and Caveolae and Their Role in Compartmentation of Redox Signaling* Antioxid Redox Signal 11: 1357-72.

Peng A., Pisal D.S., Doty A., Balu-Iyer S.V. (2012) *Phosphatidylinositol induces fluid phase formation and packing defects in phosphatidylcholine model membranes* Chem Phys Lipids 165: 15-22.

Phelan A.M., Lange D.G. (1991) *Ischemia/reperfusion-induced changes in membrane fluidity characteristics of brain capillary endothelial cells and its prevention by liposomal-incorporated superoxide dismutase* Biochim Biophys Acta 1067: 97-102.

Pitto M., Raimondo F., Zoia C., Brighina L., Ferrarese C., Masserini M. (2005) *Enhanced GM1 ganglioside catabolism in cultured fibroblasts from Alzheimer patients* Neurobiol Aging 26: 833-8.

Pluta R., Jabłoński M., Ułamek-Kozioł M., Kocki J., Brzozowska J., Januszewski S., Furmaga-Jabłońska W., Bogucka-Kocka A., Maciejewski R., Czuczwar S.J. (2013) *Sporadic Alzheimer's disease begins as episodes of brain ischemia and ischemically dysregulated Alzheimer's disease genes* Mol Neurobiol 48: 500-15.

Pluta R., Ułamek M., (2008) *Brain ischemia and ischemic blood-brain barrier as etiological factors in sporadic Alzheimer's disease* Neuropsychiatric Disease and Treatment 4: 855-864.

Popescu B.O., Toescu E.C., Popescu L.M., Bajernaru O., Muresanu D.F., Schultzberg M., Bogdanovic N., (2009) *Blood-brain barrier alterations in ageing and dementia* J Neurol Sci 283: 99-106.

Puglielli L., Konopka G., Pack-Chung E., Ingano L.A., Berezovska O., Hyman B.T., Chang T.Y., Tanzi R.E., Kovacs D.M. (2001) *Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide* Nat Cell Biol 3: 905-12.

Qing H., Zhou W., Christensen M.A., Sun X., Tong Y., Song W., (2004) *Degradation of BACE by the ubiquitin-proteasome pathway* FASEB J 18: 1571-1591.

Ramirez M.R., Muraro F., Zylbersztein D.S., Abel C.R., Arteni N.S., Lavinsky D., Netto C.A., Trindade V.M. (2003) *Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus* Neurosci Res 46: 339-47.

Rao J.S., Kellom M., Kim H.W., Rapoport S.I., Reese E.A. (2013) *Neuroinflammation and synaptic loss* Neurochem Res 37: 903-10.

Rao A.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J. (2000) *Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection* J Neurochem 75: 2528-35.

Ratan R.R., Siddiq A., Smirnova N., Karpisheva K., Haskew-Layton R., McConoughey S., Langley B., Estevez A., Huerta P.T., Volpe B., Roy S., Sen C.K. Gazaryan I., Cho S., Fink M., LaManna J., (2007) *Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat and repair stroke* J Mol Med (Berl) 85: 1331-1338.

Ray P., Ray R., Broomfield C.A., Berman J.D. (1994) *Inhibition of bioenergetics alters intracellular calcium, membrane composition, and fluidity in a neuronal cell line* Neurochem Res 19: 57-63.

Rodrigo R., Miranda-Merchak A., Valenzuela Grau R., Bachler J.P., Vergara L. (2013) *Modulation of (Na,K)-ATPase activity by membrane fatty acid composition: therapeutic implications in human hypertension* Clin Exp Hypertens [Epub ahead of print].

Roux F., Couraud P-O., (2005) *Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions* Cell Mol Neurobiol 25: 41-58.

Roychaudhuri R., Yang M., Hoshi M.M., Teplow D.B. (2009) *Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease* J Biol Chem 284: 4749-53.

Ruitenbergh A., den Heijer T., Bakker S.L., van Swieten J.C., Koudstaal P.J., Hofman A., Breteler M.M. (2005) *Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study* Ann Neurol 57: 789-94.

Rushworth J.V., Hooper N.M. (2010) *Lipid rafts: linking Alzheimer's amyloid- β production, aggregation and toxicity at neuronal membranes* Int J Alzheimers Dis 27: 603052.

- Saha A., Sarkar C., Singh S.P., Zhang Z., Munasinghe J., Peng S., Chandra G., Kong E., Mukherjee A.B. (2012) *The blood-brain barrier is disrupted in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: amelioration by resveratrol* Hum Mol Genet 21: 2233-44.
- Sagare A.P., Bell R.D., Zlokovic B.V. (2012) *Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β -peptide clearance in Alzheimer disease* Cold Spring Harb Perspect Med 1: 2.
- Saini H.K., Arneja A.S., Dhalla N.S. (2004) *Role of cholesterol in cardiovascular dysfunction* Can J Cardiol 20: 333-46.
- Salmina A.B., Inzhutova A.I., Malinovskaya N.A., Petrova M.M. (2010) *Endothelial dysfunction and repair in Alzheimer-type neurodegeneration: neuronal and glial control* J Alzheimers Dis 22: 17-36.
- Sanchez-Mejia R.O., Mucke L. (2010) *Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease* Biochim Biophys Acta 1801: 784-90.
- Sanchez-Mejia R.O., Newman J.W., Toh S., Yu G.Q., Zhou Y., Halabisky B., Cissé M., Scarce-Levie K., Cheng I.H., Gan L., Palop J.J., Bonventre J.V., Mucke L. (2008) *Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease* Nat. Neurosci 11: 1311-8.
- Sathya M., Premkumar P., Karthick C., Moorthi P., Jayachandran K.S., Anusuyadevi M. (2012) *BACE1 in Alzheimer's disease* Clin Chim Acta 414: 171-8.
- Sawamura N., Ko M., Yu W., Zou K., Hanada K., Suzuki T., Gong J.S., Yanagisawa K., Michikawa M. (2004) *Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids* J Biol Chem 279: 11984-91.
- Schonfeld P., Schlüter T., Fischer K.D., Reiser G. (2011) *Non-esterified polyunsaturated fatty acids distinctly modulate the mitochondrial and cellular ROS production in normoxia and hypoxia* J Neurochem 118: 69-78.

- Schroeder R., London E., Brown D. (1994) *Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behaviour* Proc Natl Acad Sci USA 91: 12130-4.
- Schweinzer C., Kober A., Lang I., Etschmaier K., Scholler M., Kresse A., Sattler W., Panzenboeck U. (2011) *Processing of endogenous A β PP in blood-brain barrier endothelial cells is modulated by liver-X receptor agonists and altered cellular cholesterol homeostasis* J Alzheimers Dis 27: 341-60.
- Reiss A.B., Voloshyna I. (2012) *Regulation of cerebral cholesterol metabolism in Alzheimer disease* J Investig Med 60: 576-82.
- Skretteberg P.T., Grytten A.N., Gjertsen K., Grundvold I., Kjeldsen S.E., Erikssen J., Mellbin L., Liestøl K., Fraser D.A., Erikssen G., Pedersen T.R., Bodegard J. (2013) *Triglycerides-diabetes association in healthy middle-aged men: modified by physical fitness? A long term follow-up of 1962 Norwegian men in the Oslo Ischemia Study* Diabetes Res Clin Pract 101: 201-9.
- Shankar G.M., Walsh D.M. (2009) *Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Abeta* Mol Neurodegener 4: 48.
- Sharp F.R., Bernaudin M., (2004) *HIF1 and oxygen sensing in the brain* Nat Rev 5: 437-448.
- Shi L.Z., Li G.J., Wang S., Zheng W., (2008) *Use of Z310 cells as an in vitro blood-cerebrospinal fluid barrier model: tight junction proteins and transport properties* Toxicol in vitro 22: 190-199.
- Simão F., Matté A., Breier A.C., Kreutz F., Trindade V.M., Netto C.A., Salbego C.G. (2013) *Resveratrol prevents global cerebral ischemia-induced decrease in lipid content* Neurol Res 35: 59-64.
- Simons K., Ikonen E. (1997) *Functional rafts in cell membranes* Nature 387: 569-72.
- Slooter A.J., Cruts M., Kalmijn S., Hofman A., Breteler M.M., Van Broeckhoven C., van Duijn C.M. (1998) *Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based incidence study: the Rotterdam Study* Arch Neurol 55: 964-8.

Smith J.L., Pillay S.P., de Jersey J., Hardie I.R. (1989) *Effect of ischaemia on the activities of human hepatic acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and other microsomal enzymes* Clin Chim Acta 184: 259-68.

Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A. (2006) *Gangliosides as components of lipid membrane domains* Glycobiology 17: 1R-13R.

Stewart P.A., Wiley M.J. (1981) *Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier* J Comp Neurol 202: 157-67.

Stockley J.H., O'Neill C., (2008) *Understanding BACE1: essential protease for amyloid- β production in Alzheimer's disease* Cell Mol Life Sci 65: 3265-3289.

Stokes C.E., Hawthorne J.N. (1987) *Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains* J Neurochem 48: 1018-21.

Sugibayashi K., Onuki Y., Takayama K. (2009) *Displacement of tight junction proteins from detergent-resistant membrane domains by treatment with sodium caprate* Eur J Pharm Sci 36: 246-53.

Sun X., He G., Zhou H., Dobie F., Cai F., Staufenbiel M., Huang L.E., Song W., (2006) *Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression* PNAS 103: 18727-18732.

Svennerholm L., Gottfries C.G. (1994) *Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II)* J Neurochem 62: 1039-47.

Svennerholm L. (1957) *Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method* Biochim Biophys Acta 24: 604-11.

Tamagno E., Guglielmotto M., Monteleone D., Vercelli A., Tabaton M. (2012) *Transcriptional and post-transcriptional regulation of β -secretase* IUBMB Life 64: 943-50.

Tamboli I.Y., Prager K., Barth E., Heneka M., Sandhoff K., Walter J. (2005) *Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide* J Biol Chem 280: 28110-7.

Taylor D.R., Hooper N.M. (2007) *Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-beta proteins* Semin Cell Dev Biol 18: 638-48.

Tsukitani M., Okamoto R., Fukuzaki H. (1984) *Effect of hypoxia on cholesterol accumulation in cultured rabbit aortic smooth muscle cells* Atherosclerosis 52: 167-74.

van Holten T.C., Waanders L.F., de Groot P.G., Vissers J., Hoefler I.E., Pasterkamp G., Prins M.W., Roest M. (2013) *Circulating biomarkers for predicting cardiovascular disease risk; a systematic review and comprehensive overview of meta-analyses* PLoS One 8: e62080.

Vance J.E. (2012) *Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases* Dis Model Mech 5: 746-55.

Vermeer S.E., Prins N.D., den Heijer T., Hofman A., Koudstaal P.J., Breteler M.M. (2003) *Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline* N Engl J Med 348: 1215-22.

Vestergaard M., Hamada T., Morita M., Takagi M. (2010) *Cholesterol, lipids, amyloid Beta, and Alzheimer's* Curr Alzheimer Res 7: 262-70.

Vetrivel K.S., Thinakaran G. (2010) *Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production* Biochim Biophys Acta 1801: 860-7.

Vetrivel K.S., Meckler X., Chen Y., Nguyen P.D., Seidah N.G., Vassar R., Wong P.C., Fukata M., Kounnas M.Z., Thinakaran G. (2009) *Alzheimer disease Abeta production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts* J Biol Chem 284: 3793-803.

Vetrivel K.S., Thinakaran G., (2006) *Amyloidogenic processing of β -amyloid precursor protein in intracellular compartments* Neurobiology 66: S69-S73.

Wallace M.A. (1994) *Effects of Alzheimer's disease-related beta amyloid protein fragments on enzymes metabolizing phosphoinositides in brain* Biochim Biophys Acta 1227: 183-7.

Wexler B.C. (1970) *Metabolic changes in response to acute cerebral ischemia following bilateral carotid artery ligation in arteriosclerotic versus nonarteriosclerotic rats* Stroke 1: 112-21.

Whitehead S.N., Chan K.H., Gangaraju S., Slinn J., Li J., Hou S.T. (2011) *Imaging mass spectrometry detection of gangliosides species in the mouse brain following transient focal cerebral ischemia and long-term recovery* PLoS One 6: e20808.

Wilhelm I., Fazakas C., Krizbai I.A. (2011) *In vitro models of the blood-brain barrier* Acta Neurobiol Exp (Wars) 71: 113-28.

Wolburg H., Noell S., Mack A., Wolburg-Buchholz K., Fallier-Becker P. (2009) *Brain endothelial cells and the glio-vascular complex* Cell Tissue Res 335: 75-96.

Xue S., Jia L., Jia J., (2006) *Hypoxia and reoxygenation increased BACE1 mRNA and protein levels in human neuroblastoma SH-SY5Y cells* Neurosci Lett 405: 231-235.

Yamada E. (1955) *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse* J Biophys Biochem Cytol 1: 445-458.

Yamamoto N., Igbabvoa U., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y., Kobayashi M., Wood W.G., Fujita S.C., Yanagisawa K. (2004) *Accelerated Abeta aggregation in the presence of GM1-ganglioside-accumulated synaptosomes of aged apoE4-knock-in mouse brain* FEBS Lett 569: 135-9.

Yanagisawa K. (2007) *Role of gangliosides in Alzheimer's disease* Biochim Biophys Acta 1768: 1943-51.

Yang X., Askarova S., Lee J.C-M. (2010) *Membrane Biophysics and Mechanics in Alzheimer's Disease* Mol Neurobiol 41:138-148.

- Yang Y., Rosenberg G.A. (2011) *Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease* Stroke 42: 3323-8.
- Yuyama K., Yanagisawa K. (2010) *Sphingomyelin accumulation provides a favorable milieu for GM1 ganglioside-induced assembly of amyloid beta-protein* Neurosci Lett 481: 168-72.
- Zámbó V., Simon-Szabó L., Szelényi P., Kereszturi E., Bánhegyi G., Csala M. (2013) *Lipotoxicity in the liver* World J Hepatol 5: 550-557.
- Zha Q., Ruan Y., Hartmann T., Beyreuther K., Zhang D. (2004) *GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein* Mol Psychiatry 9: 946-52.
- Zhang Y.W., Thompson R., Zhang H., Xu H. (2011) *APP processing in Alzheimer's disease* Mol Brain 4: 3.
- Zhang X., Zhou K., Wang R., Cui J., Lipton S.A., Liao F-F., Xu H., Zhang Y-W., (2007) *Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and β -amyloid generation* J Biol Chem 282: 10873-10880.
- Zhou Y., Yang L., Ma A., Zhang X., Li W., Yang W., Chen C., Jin X. (2012) *Orally administered oleylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor α* Neuropharmacology 63: 242-9.
- Zhou W., Qing H., Tong Y., Song W., (2004) *BACE1 gene expression and protein degradation* Ann NY Acad Sci 1035: 49-67.
- Zlokovic B.V. (2011) *Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders* Nat Rev Neurosci 12: 723-38.
- Zlokovic B.V. (2005) *Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration* Trends Neurosci 28: 202-8.
- Zlokovic B.V. (2002) *Vascular disorder in Alzheimer's disease: role in pathogenesis of dementia and therapeutic targets* Adv Drug Deliv Rev 54: 1553-9.

PUBBLICAZIONI

Bulbarelli A., Lonati E., **Brambilla A.**, Orlando A., Cazzaniga E., Piazza F., Ferrarese C. Masserini M., and Sancini G. (2012) *A β ₄₂ production in brain capillary endothelial cells after oxygen and glucose deprivation* Mol. Cell Neurosci 49; 415-22.

COMUNICAZIONI ORALI

Partecipazione alla XX giornata LLP (sezione ligure-lombardo-piemontese) organizzata dalla SIB (società italiana di biochimica e biologia molecolare).

Abstract presentato: “Increased A β ₄₂ peptide production in brain capillary endothelial cells after oxygen and glucose deprivation” (Alessandra Bulbarelli, Elena Lonati, **Anna Brambilla**, Antonina Orlando, Emanuela Cazzaniga, Fabrizio Piazza, Carlo Ferrarese, Massimo Masserini, Giulio Sancini).

RINGRAZIAMENTI

Ed eccoci, di nuovo!

Che dire?

Il primo grande GRAZIE non può non andare al lab 2.8 al gran completo per essere stato un meraviglioso luogo di crescita professionale e personale.

GRAZIE ad Ale per avermi offerto la possibilità del dottorato, per avermi sempre supportato e spronato, anche quando ero io la prima ad avere dei dubbi, per avermi sempre spinto a pormi domande a cui cercare di dare una risposta (in infiniti brainstorming), per avermi mostrato come migliorare dai miei errori e per avermi fatto toccare con mano quanto il lavoro di laboratorio possa essere “divertente” (nonostante le luci tremolanti a tarda ora).

Dimenticavo.. Grazie per il tuo infinito apprezzamento per la cheesecake, le pastine di mela e i biscotti.

GRAZIE ad Ele per il grandissimo sostegno e la fiducia che mi hai sempre dato, a volte forse eccessiva, per la tua strenua difesa delle cellule ippocampali e delle proteine, per le chiacchierate nel tardo pomeriggio e per la tua disponibilità immediata anche al di fuori del lavoro.

GRAZIE ad Ema per avermi supervisionato nelle mie prime “fasi lipidiche”, per gli avventurosi cambi d’olio al liofilizzatore e per essere la componente decisionale della “macchina- Brianza”.

GRAZIE ad Anto per la dedizione e la forza che metti nel lavoro, per la preoccupazione che mostri verso la nostra alimentazione e per essere la nostra fashion creator preferita.

GRAZIE a Chiara, la “mia” non tesista, per l’aiuto pratico di questo ultimo periodo, per avermi sorretto in numerose “emergenze” (sperimentali e non) e per aver condiviso la mia passione per la criminologia, il giallo e il mistero in generale.

GRAZIE a Bea, la “mia” tesista.. per circa un mese. Per la tua risposta pronta, la tua voglia di metterti in gioco e la tua leggera punta di ansia in queste ultime settimane (dopo tutte le dita incrociate per noi, direi che te lo puoi anche permettere).

GRAZIE ad Elena per aver condiviso gli alti e bassi dell’analisi dei lipidi (soprattutto gli infiniti tentativi di “far correre” i gangliosidi) e le interminabili letture al fluorimetro.

GRAZIE ad Ester per la passione e la spontaneità che metti in tutto ciò che fai. Anzi direi che adesso la frase dovrebbe essere più o meno così: Vielen Danke für deine Passion und Natürlichkeit.

GRAZIE a Martina che pur a distanza continua a ricordarsi del lab 2.8.

Infine, GRAZIE a Valeria e a tutti i tesisti passati dal lab 2.8.

GRAZIE a Laura per tutta la pazienza e la disponibilità mostrata ogni volta che ho fatto capolino nel lab 2.9 in cerca di materiale, codici per richiedere il CIG (!), consigli per i nuovi protocolli da utilizzare e per aver sopportato i miei sfoghi sui gangliosidi (che proprio non mi vanno a genio).

GRAZIE a Francesca per aver condiviso le molteplici letture allo spettrofotometro nella speranza che il colore virasse, ma non troppo.

GRAZIE alla prof. Palestini per la disponibilità e l'aiuto nell'interpretazione dei dati.

GRAZIE a Giulio per la tua passione verso la barriera ematoencefalica.

GRAZIE a Silvia per aver sopportato le molte interruzioni al tuo lavoro ogni volta che sono piombata nel tuo studio alla ricerca dell'Ale, per la tua compagnia al caffè e a pranzo quest'estate e per il tuo interesse verso quello che potrebbe essere il "dopo dottorato".

GRAZIE al lab 3.15 per i consigli da "lipidologhe".

GRAZIE a Vale e Ali per essere sempre al mio fianco, perché sopportate i miei momenti no, le mie vette di acidità (che però condividete anche), le mie fisse (sì lo riconosco, qualcuna ne ho) e perché condividete i successi, le paure e i sogni (uno di questi già prenotato, perché siamo decisamente avanti).

GRAZIE a Sara perché anche tu in quanto a dolcezza non scherzi e per il tuo ingenuo candore.

GRAZIE a Lollo e Cla per il supporto.

GRAZIE a Carla e Giuseppe per aver partecipato ai miei "giorni importanti" con il loro incoraggiamento.

GRAZIE a tutti gli amici, di vecchia data o "di più recente acquisizione", vicini e lontani, che frequento spesso o più raramente, per aver contribuito al mio essere qui.

GRAZIE a Luca per il tuo sgranare gli occhi quando Dario ti dice che le serate poker per me sono off limits perché faccio "nottata" in lab.

GRAZIE a Daniela che, in questo periodo, condivide con me il divano come luogo di ripasso/ scrittura.

Grazie alla famiglia che tuttora non ha ben chiaro cosa io faccia in laboratorio, né cosa succederà adesso, alla fine del dottorato, (tanto quello non lo so nemmeno io) ma che continua imperterrita a sostenermi.

GRAZIE a Erika che ha imparato che in vista della laurea la cosa più importante è avere molteplici copie della tesi salvate in altrettanti posti diversi per evitare di perdere e far perdere a chi ti sta intorno anni di vita.

GRAZIE a Gloria per aver compreso e a volte sperato nei miei ritorni a casa troppo tardi per la palestra.

GRAZIE a Dario che, pur fiero del suo essere un CTF, riconosce che la biologia ha il suo fascino! E si preoccupa che io non misceli strani composti (perché, sai, prendono fuoco..). Perché mi sopporti quando i miei nervi sono tesi e per l'incoraggiamento (perché in fondo “di certi esponenti delle giovani leve di biologi posso anche non preoccuparmi”).

GRAZIE a mamma e papà per aver ascoltato e vissuto i miei momenti di crisi (perché sì ne ho avuti) prima e dopo l'entrata in dottorato. Per aver sempre accettato le mie scelte, lavorative e non, convinti che io dovessi scegliere quello che ritenevo e ritengo il meglio.