



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
NEUROSCIENZE
XXII° CICLO

**"Il complesso della proteina chinasi DNA-PK: modulazione mediata
dal peptide beta amiloide e coinvolgimento nella plasticità sinaptica"**

Dr. Mauro Racaniello

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Dott.ssa Daniela Merlo

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

1 INTRODUZIONE	3
1.1 LA RIPARAZIONE DEL DNA.....	3
1.1.1 I sistemi di riparazione del DNA.....	3
1.1.2 La riparazione del DNA nei neuroni.....	11
1.1.3 Il sistema di riparazione della NHEJ.....	13
1.1.4 Il complesso della DNA-PK	16
1.2 LA RIPARAZIONE DEL DNA NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE.....	20
1.2.1 Il danno al DNA nella malattia di Alzheimer e il ruolo del peptide β -amiloide.....	22
1.2.2 Deficit dei sistemi di riparazione del DNA nella malattia di Alzheimer.....	25
2 OBIETTIVI DELLA RICERCA	28
3 MATERIALI E METODI	29
4 RISULTATI	38
4.1 Caratterizzazione della localizzazione subcellulare del complesso DNA-PK in cellule PC12...38	
4.2 Effetti del trattamento con la forma aggregata del peptide A β 25-35 sulla vitalità cellulare39	
4.3 Concentrazioni subletali del peptide A β 25-35 inibiscono l'attività chinastica della DNA-PK...42	
4.4 Lo stress ossidativo contribuisce all'azione inibitoria del peptide A β 25-35 nei confronti dell'attività chinastica della DNA-PK	45
4.5 A β è in grado di inibire direttamente l'attività chinastica della DNA-PK.....	47
4.6 Espressione del complesso della DNA-PK in diverse aree cerebrali murine.....	47
4.7 Localizzazione e attività chinastica della DNA-PKcs nelle membrane sinaptiche.....	50
4.8 La DNA-PKcs è associata alle subunità NR1 e NR2A del recettore NMDA ed alla proteina PSD95 nelle membrane sinaptiche.....	53
4.9 Il potenziamento a lungo termine è compromesso in animali mutanti per la DNA-PKcs.....	55
5 DISCUSSIONE	57
6 BIBLIOGRAFIA	61

1. INTRODUZIONE

1.1 LA RIPARAZIONE DEL DNA

La vita di ogni organismo e la sua capacità di trasmettere il proprio patrimonio genetico di generazione in generazione, dipendono dalla stabilità a lungo termine dell'informazione genetica contenuta nel loro genoma. Questa stabilità non è dovuta ad una invulnerabilità al danno, ma è il risultato dell'azione ininterrotta di enzimi che riparano i danni a cui il materiale genetico è costantemente sottoposto. Senza efficienti sistemi di riparazione, il genoma non sarebbe in grado di mantenere le funzioni cellulari essenziali per più di qualche ora prima che geni chiave vengano inattivati, e analogamente, le cellule accumulerebbero errori di replicazione ad una velocità tale che il loro genoma non sarebbe più funzionale dopo poche divisioni cellulari.

La riparazione del DNA consiste in una complessa e integrata rete di segnalazioni in grado di ristabilire la corretta struttura e funzionalità della molecola di DNA danneggiata. Le cellule devono coordinare la riparazione con altri processi cellulari quali la replicazione, la trascrizione ed il ciclo cellulare, prima di potersi dividere nuovamente. Esse sono generalmente capaci di tollerare una certa quantità di danno riuscendo comunque a mantenere integra la loro funzionalità, ma superata una certa soglia critica, oltre la quale il danno diventa irreparabile, vanno incontro ad apoptosi.

Difetti nella riparazione del DNA, causati ad esempio da mutazioni dei geni che codificano per le proteine del riparo, sono alla base di diverse patologie e in generale causano instabilità genomica, immunodeficienza, neurodegenerazione, invecchiamento precoce e predisposizione allo sviluppo di tumori.

1.1.1 I sistemi di riparazione del DNA

Numerosi fattori concorrono a danneggiare il DNA e generalmente vengono classificati come endogeni ed esogeni. Tra i fattori endogeni più pericolosi vanno ricordate alcune reazioni chimiche quali l'idrolisi spontanea e l'ossidazione dovuta alla presenza di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS), mentre raggi ultravioletti (UV) e mutageni chimici sono alcuni tra i fattori ambientali che più frequentemente causano lesioni al DNA. Esistono diversi tipi di lesioni al DNA e ognuna è generalmente caratteristica di un tipo di fattore (figura1).

Un tipo molto comune di lesione è rappresentata dalla rimozione di basi azotate in un sito specifico, purina o pirimidina, con la comparsa di un cosiddetto sito abasico. Questi siti apurinici/apirimidinici possono formarsi spontaneamente oppure durante il normale processo di riparazione del DNA (Lindahl 1993). I siti apurinici/apirimidinici sono causati principalmente dall'azione dei ROS, i

quali, attaccando lo scheletro della molecola di DNA, possono causare il rilascio di basi azotate (Atamna et al., 2000). È stato stimato che i ROS prodotti dal normale metabolismo aerobio, sono in grado di formare ogni giorno approssimativamente dai 50.000 ai 200.000 siti abasici per cellula e che i livelli di queste lesioni aumentano con l'invecchiamento (Atamna et al., 2000).

Un altro tipo di lesione è generata dalla reazione tra la molecola di DNA e una molecola endogena o esogena, con la formazione di un addotto di Lewis. Questo addotto stabile, contiene un legame dativo (o di coordinazione), che possiede energia sufficientemente alta da potersi considerare, almeno in condizioni fisiologiche, irreversibile. Questo tipo di lesione sembra essere correlato alla formazione di tumori (Li et al., 1999).

Un altro tipo di danno, per certi versi simile a quello prodotto dall'addotto, è causato dalla formazione di complessi DNA-proteina ed è il cosiddetto DNA-protein cross-link. Questo tipo di danno è generalmente provocato da vari tipi di agenti chimici (es. arsenico e cromati), molti dei quali sono noti essere cancerogeni e da droghe con azione citostatica come il cisplatino. Questo tipo di lesioni è in grado di interferire con i processi di trascrizione e replicazione del DNA (Rao 1993).

Una delle forme più studiate di danno è sicuramente l'ossidazione delle basi di guanina e adenina. Questa reazione radicalica, causata dallo stress ossidativo, genera come prodotti di reazione la 7,8-diidro-8-ossiguanina (8-oxoG), la 8-idro-deossiguanosina (OHdG) e la 2-idrossi-adenina (2-OH-A). A causa della loro capacità di formare appaiamenti diversi da quelli canonici durante la replicazione e la trascrizione, queste basi ossidate sono considerate altamente mutageniche. In particolare la 8-oxoG può appaiarsi anche con l'adenina dando luogo a transversioni GC→TA e AT→CG. La 2-OH-A può appaiarsi in maniera promiscua e dare luogo sia a transizioni che a transversioni (AT→CG, AT→GC, AT→TA, GC→TA). La 8-oxoG è una lesione particolarmente frequente e la sua pericolosità per la cellula è resa evidente dalla presenza di differenti sistemi di controllo in grado di rimuovere questa base ossidata. È stato osservato che la 8-oxoG si accumula preferenzialmente lungo certe sequenze di DNA ed è possibile che il danno al DNA con maggiori ripercussioni avvenga in regioni con funzione di promotore (Toyokuni et al., 1999).

Un'altra reazione di ossidazione che si riscontra frequentemente (dalle 100 alle 500 volte al giorno per cellula) è la deaminazione idrolitica della citosina con formazione di 5-idrossiuracile. Anch'essa, come quelle descritte in precedenza è mutagenica perché in grado di dare transizioni C→T (Endres et al., 2004).

Tra i vari tipi di danno al materiale genetico, la rottura dello scheletro di deossiribosio-fosfato che costituisce la doppia elica è considerata la lesione più importante dal punto di vista genotossico. Essa rappresenta una vera e propria interruzione nella continuità della molecola di DNA.

Esistono due forme di rotture, quelle a singolo filamento (single-strand breaks,SSBs) e quelle a doppio filamento (double-strand breaks, DSBs).

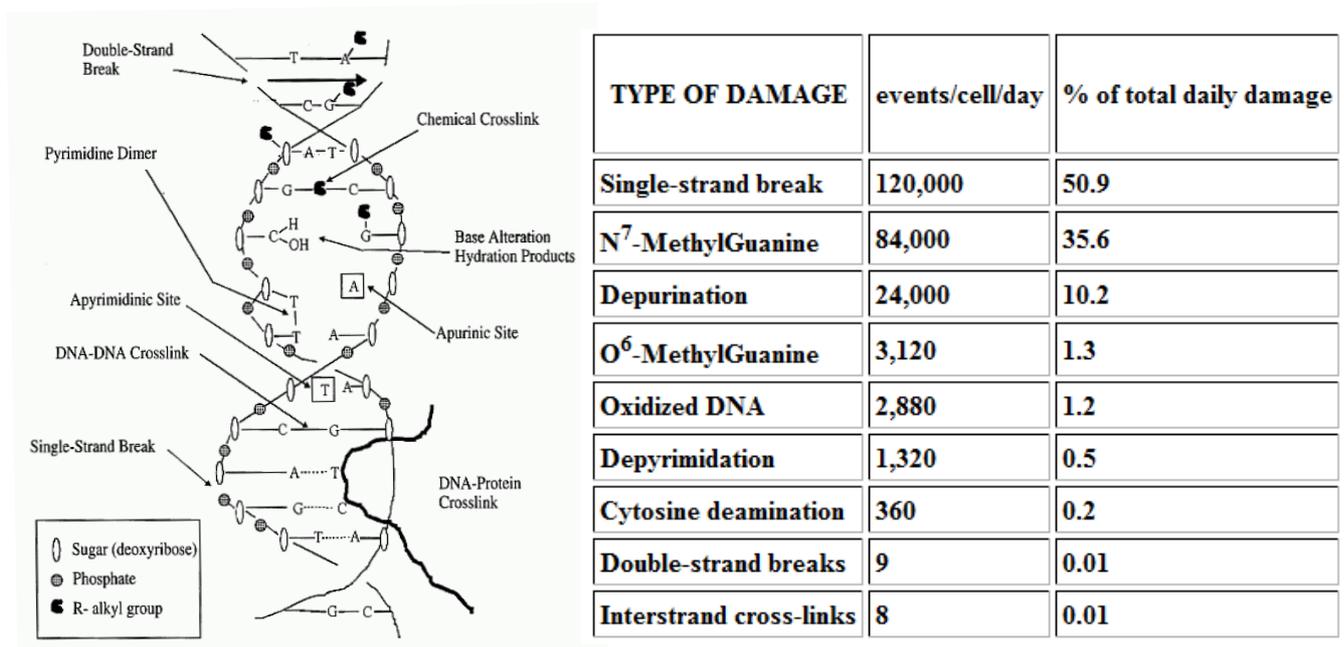


Figura 1. In questa figura sono mostrati i vari tipi di lesioni che colpiscono la molecola di DNA e la frequenza giornaliera con cui si verificano (tratta da www.benbest.com).

Migliaia di rotture a singolo filamento compaiono ogni giorno in una cellula e se non riparate in modo corretto possono bloccare i processi di trascrizione e replicazione e trasformarsi nelle ancor più dannose rotture a doppio filamento. Le rotture a singolo filamento del DNA possono formarsi direttamente come conseguenza dell'azione di agenti endogeni o esogeni che, attaccando lo scheletro di deossiribosio-fosfato della molecola, rompono il legame fosfodiesterico che tiene uniti i nucleotidi tra di loro, formando un intervallo nella continuità della doppia elica. Come risultato si generano estremità libere a singolo filamento, che generalmente contengono terminazioni non canoniche; per esempio i SSBs prodotte dall'azione dei ROS o dalle radiazioni ionizzanti, quasi sempre contengono gruppi monofosfato o fosfoglicolato (Fortini et al., 2007). I SSBs possono originarsi anche indirettamente a causa di un processamento errato delle basi azotate durante la normale riparazione del DNA, per esempio per eliminare i siti abasici o le basi ossidate descritte in precedenza.

Tra i diversi tipi di danno al DNA, la rottura della doppia elica è considerata la lesione più pericolosa dal punto di vista della stabilità genomica. I DSBs possono verificarsi in seguito all'esposizione a radiazioni ionizzanti o composti radiomimetici, così come dall'azione dei radicali

liberi prodotti dal metabolismo cellulare. Questo tipo di rotture può anche prodursi come conseguenza della riparazione delle singole rotture al DNA o di danni alle basi, durante la ricombinazione meiotica e durante il riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline. I DSBs possono anche formarsi quando le forche replicative impegnate nella duplicazione del DNA, incontrano lesioni sulle basi azotate che ne bloccano l'avanzamento lungo il cromosoma. Si genera così una situazione di stallo che porta al collasso della forza replicativa e alla formazione di una rottura a doppio filamento. Recentemente è stato ipotizzato che i DSBs possono formarsi anche durante la riparazione associata alla trascrizione TCR (Transcription-coupled Repair, TCR), e che questo meccanismo può coinvolgere geni normalmente associati alla riparazione delle rotture a doppio filamento (Guirouilh-Barbat et al., 2008).

Se non venissero riparate, i DSBs causerebbero un'ampia varietà di alterazioni genetiche, incluse delezioni, perdita di eterozigosi, traslocazioni e perdita di interi cromosomi.

Ogni giorno le cellule sono continuamente sottoposte all'azione genotossica di molte sostanze, sia endogene che ambientali. I diversi tipi di lesioni al DNA che risultano da questa azione, vengono rapidamente identificati e immediatamente, viene attivata una intricata rete di segnalazioni, nota come risposta al danno al DNA (DNA damage response, DDR) (figura2).

Questa risposta culmina nell'attivazione dei checkpoint cellulari e nell'attivazione dell'appropriato sistema di riparazione, oppure in certi contesti, all'innescamento di un programma di morte (Jackson et al., 2009). La DDR è un processo gerarchico che si esplica attraverso un serie precisa di passaggi. Per prima cosa avviene il riconoscimento della lesione sul DNA ad opera di proteine specializzate chiamate sensori (DDR-sensor protein, DDRS). In seguito al riconoscimento del danno, altre proteine chiamate trasduttori (DDR-transducer protein, DDRT) vengono reclutate sul sito della lesione in modo tale da trasmettere il segnale alla ultima serie di proteine coinvolte, chiamate effettori (DDR-effector protein, DDRE). Queste ultime svolgono diverse funzioni, tra cui: riparare materialmente il danno, regolare il ciclo cellulare durante la riparazione, modificare la trascrizione genica e, nel caso di irreparabilità del danno, innescare un programma di morte.

Per fare fronte alla diversa natura delle lesioni al DNA, le cellule hanno sviluppato numerosi sistemi di riparazione specializzati (tabella 1). Questi includono:

- la riparazione per escissione nucleotidica (Nucleotide excision repair, NER), un sistema molto versatile in grado di rimuovere una grande varietà di lesioni. Il danno riparato dal sistema NER coinvolge solitamente filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi, che mostrano voluminose distorsioni della doppia elica, come quelle generate da dimeri di pirimidina e addotti, ed alcuni tipi di fotoprodotto generati da radiazioni ultraviolette (Ultraviolet -C, UV-C) (Gilet et al., 2006).

Il NER è suddiviso in due sottosistemi di riparazione a seconda che la lesione sia localizzata nelle regioni trascritte, e quindi si parla di riparazione accoppiata alla trascrizione (Transcription-coupled repair, TCR) oppure in regioni non trascritte del genoma, in tal caso si parla di riparazione globale del genoma (Global-genome repair, GGR) (Hoeijmakers 2001; Mitchell et al., 2003).

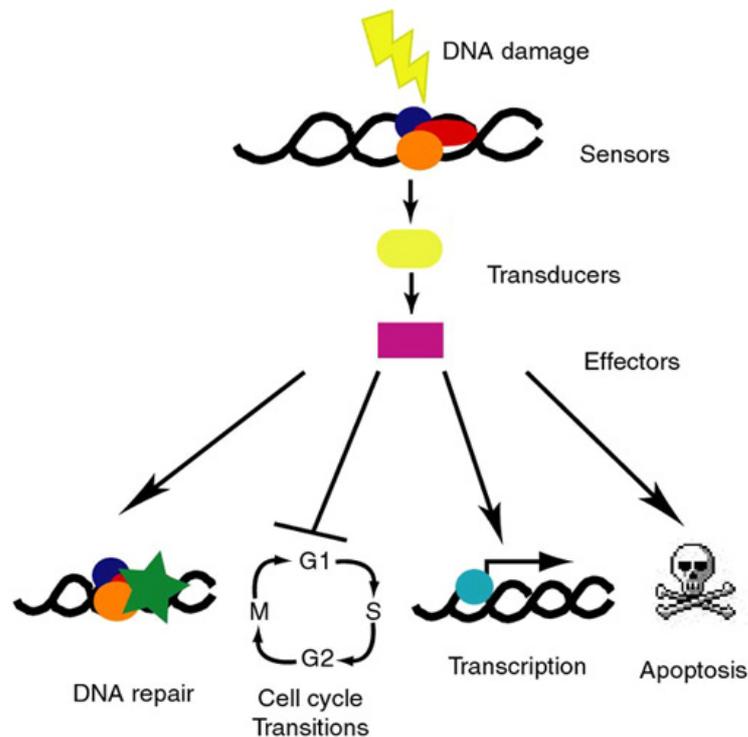


Figura 2. Schema rappresentativo del processo gerarchico della risposta al danno al DNA (DDR). In seguito ad un danno al DNA viene innescata una cascata di eventi che genera differenti risposte cellulari a seconda dell'entità e della natura del danno, (tratta da Zhou e Elledge, 2000).

L'importanza biologica del NER è resa evidente in malattie genetiche causate da difetti di questo sistema di riparazione: lo Xeroderma Pigmentosum (XP), la Sindrome di Cockaine (CS), la Tricotiodistrofia (TTD) e alcune malattie associate con sintomi combinati di XP/CS e XP/TTD (Cleaver 2005). La sequenza enzimatica alla base del NER può essere schematizzata come segue: XPA (endonucleasi), che riconosce il sito da riparare; XPB e XPD (elicasi), che srotolano l'elica; XPG e XPF (endonucleasi,) che tagliano ed eliminano il nucleotide; DNA-polimerasi, che aggiunge il nuovo nucleotide; ligasi, che "ricuce" il filamento riparato.

- la riparazione per escissione di basi (base excision repair, BER), un sistema che ripara il danno causato da ossidazione, alchilazione, idrolisi e deaminazione di basi azotate. Gli enzimi riparatori di questo sistema sono gli stessi che riparano le rotture del DNA a singolo filamento. Il meccanismo

enzimatico è caratterizzato da cinque reazioni altamente coordinate: (a) la rimozione della base danneggiata ad opera di DNA glicosilasi specifiche; (b) l'incisione del risultante sito abasico catalizzata da una AP endonucleasi; (c) il processamento dei terminali prodotti; (d) la sintesi dei nucleotide/i mancanti; (e) e infine il ripristino dell'integrità della catena fosfodiesterica del DNA da parte di una DNA ligasi.

Un chiaro esempio per descrivere il meccanismo d'azione del BER è quello della 8-oxoG, una lesione particolarmente frequente e pericolosa per la cellula. Esistono due vie complementari del BER che agiscono sinergicamente per minimizzare l'effetto tossico e mutageno della 8-oxoG. La DNA glicosilasi OGG1 del BER è in grado di rimuovere la purina ossidata quando si trova nell'appaiamento 8-oxoG:C, iniziando l'evento di escissione della 8-oxoG presente sul filamento stampo di DNA. Quest'evento porta alla formazione di un sito AP, riconosciuto in seguito da un'AP-endonucleasi che incide il corpo fosfodiesterico del DNA generando un 3'-OH libero che sarà utilizzato dalla polimerasi per inserire il nucleotide corretto. Nel caso in cui durante la replicazione del DNA s'inserisca un'adenina di fronte all'8-oxoG, la DNA glicosilasi MYH rimuove l'adenina ripristinando un appaiamento 8-oxoG:C, ricostituendo in tal modo un substrato per OGG1. Anche se fino ad ora non sono state descritte malattie associate a mutazioni nei geni coinvolti nel BER, recentemente sono state descritte mutazioni ereditarie nel gene MYH in pazienti affetti da carcinomi e adenomi multipli coloretali (Jones et al., 2002).

Studi funzionali hanno messo in evidenza una diminuita attività glicosilasica delle varianti identificate (Chmiel et al., 2003). Crescente attenzione è stata ultimamente rivolta al ruolo giocato da alterazioni nell'espressione di enzimi del BER nell'insorgenza di alcune patologie. Harris e collaboratori (Hofseth et al., 2003) hanno dimostrato che pazienti affetti da colite ulcerosa, caratterizzata da infiammazione cronica e over-produzione di ROS, hanno una maggiore espressione e attività degli enzimi APE1 ed AAG (DNA glicosilasi specifica per le basi metilate) nei tessuti interessati all'infiammazione. Questo fenomeno era associato con la presenza di instabilità dei microsatelliti (MSI) nei tessuti esaminati. Questi dati suggeriscono che un generale disequilibrio degli enzimi coinvolti nel BER possa essere un nuovo meccanismo per l'induzione di instabilità genomica.

- la riparazione di appaiamenti errati (Mismatch Repair, MMR) è un sistema di riparazione del DNA di tipo post-replicative, che interviene nella rimozione di appaiamenti errati delle basi sfuggiti alla correzione da parte dell'attività esonucleasica 3'→5' delle DNA polimerasi (Buermeier et al., 1999). Questo sistema di riparazione gioca un ruolo cruciale nel controllare l'integrità del genoma in tutti gli organismi, dai batteri all'uomo, sia correggendo i mismatch, sia eliminando eventuali anse extra-elica più o meno estese che rappresentano i precursori delle mutazioni frameshift, sia

impedendo la ricombinazione tra sequenze omologhe, ma non identiche di DNA (De Wind et al., 1998). Il meccanismo di riparazione è multi-step e prevede una fase di riconoscimento del substrato, l'eliminazione del filamento contenente l'errore, la re-sintesi del filamento corretto e una successiva saldatura dei due filamenti. Nelle cellule di mammifero il riconoscimento del mismatch avviene ad opera del complesso eterodimerico MutS α , formato da MSH2 e MSH6, il cui legame al mismatch è stabilizzato dalla presenza dall'eterodimero di MLH1 e PMS2 (complesso MutL α). Gli altri fattori coinvolti nel MMR sono l'esonucleasi 1, FEN1, la DNA polimerasi δ , PCNA (antigene nucleare della proliferazione cellulare) e RFC (fattore di replicazione C). L'assenza di questo sistema riparativo si riflette in un aumento del tasso di mutazione spontanea (fenotipo mutatore), incluso un aumento nelle mutazioni "frameshift" con conseguente instabilità di sequenze ripetute come i microsatelliti (MicroSatellite Instability, MSI). Inoltre i topi knockout per i geni del MMR mostrano un' aumentata suscettibilità ai tumori e muoiono a circa sei mesi di vita a causa di linfomi e tumori del tratto gastrointestinale.

- la reversione diretta delle basi danneggiate (Direct Reversal of Base Damage, DRBD) è un sistema di riparazione che, a differenza di quelli visti in precedenza, non implica la rottura dei filamenti di DNA. Questo sistema di riparazione corregge il più frequente tipo di modificazione di basi azotate che si verifica spontaneamente nelle cellule, e cioè la metilazione (aggiunta di gruppi CH₃-) delle citosine seguita da una deaminazione verso la timina. Alla base del meccanismo di riparazione c'è l'azione delle glicosidasi (già viste per il BER) che rimuovono la timina appaiata erroneamente ristabilendo la citosina in posizione corretta (Eker et al., 2009).

Tabella 1. Sistemi di riparazione del DNA, (tratta da Jackson e Bartek, 2009)

DDR mechanisms and components		
DDR mechanism	Prime lesions acted upon	Key protein components
Direct lesion reversal	O ⁶ alkylguanine	O ⁶ -methylguanine methyltransferase
Mismatch repair	DNA mismatches and insertion/deletion loops arising from DNA replication	Sensors MSH2–MSH6 and MSH2–MSH3 plus MLH1–PMS2, MLH1–PMS1, PLH1–MLH3, EXO1, polymerases δ and ϵ , PCNA, RFC, RPA, ligase I
Base excision repair and SSB repair	Abnormal DNA bases, simple base adducts, SSBs generated as base-excision repair intermediates by oxidative damage or by abortive topoisomerase I activity	DNA glycosylases (sensors), APE1 endonuclease, DNA polymerases (β , δ , ϵ) and associated factors, flap endonuclease FEN1, ligase I or ligase III. SSB repair can also involve polymerase β lyase activity, XRCC1, PARP1, PARP2, polynucleotide kinase and aprataxin.
Nucleotide excision repair (NER)	Lesions that disrupt the DNA double helix, such as bulky base adducts and ultraviolet photo-products	Sensors elongating RNA polymerase, XPC–HR23B and DDB1/2, plus XPA, XPE, XPF/ERCC1, XPG, CSA, CSB, TFIIH (containing helicases XPB and XPD), DNA polymerases including polymerase κ and associated factors, PCNA, RPA, ligase I and III
Non-homologous end-joining (NHEJ)	Radiation- or chemically-induced DSBs plus V(D)J and class-switch recombination intermediates	Sensors Ku and DNA-PKcs plus XRCC4, XLF/Cernunnos and ligase IV. Can also use the MRE11–RAD50–NBS1 complex, Artemis nuclease, polynucleotide kinase, aprataxin and polymerases μ and λ .
Homologous recombination (HR)	DSBs, stalled replication forks, inter-strand DNA crosslinks and sites of meiotic recombination and abortive topoisomerase II action	RAD51, RAD51-related proteins (XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1), RAD52, RAD54, BRCA2, RPA, FEN1, DNA polymerase and associated factors. Promoted by MRN, CtIP, BRCA1 and the ATM signalling pathway.
Fanconi anaemia (FANC) pathway	Inter-strand DNA crosslinks	FANCA, FANCC, FANCD1/BRCA2, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FANCN plus factors including PALB2 and HR factors
ATM-mediated DDR signalling	DSBs	ATM, MRN and CHK2. Promoted by mediator proteins such as MDC1, 53BP1, MCPH1/BRIT1, and by ubiquitin ligases RNF8, RNF168/RIDLIN and BRCA1.
ATR-mediated DDR signalling	ssDNA, resected DSBs	Sensors ATR, ATRIP and RPA plus the RAD9–RAD1–HUS1 (9-1-1) complex, RAD17 (RFC1-like) and CHK1. Promoted by MRN, CtIP and mediator proteins such as TOPBP1, Claspin, MCPH1/BRIT1 and BRCA1.

Un discorso a parte meritano i sistemi di riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA, che rappresentano il tipo di lesioni più pericolose per l'integrità genomica. Le cellule sono in grado di riparare i DSBs attraverso due diversi sistemi di riparazione, la ricombinazione omologa (homologous Recombination, HR)(San Filippo et al., 2008) e la ricombinazione non omologa (nonhomologous end-joining, NHEJ) (Lieber 2008).

I DSBs prodotti dall'azione delle nucleasi o dalle radiazioni ionizzanti (ionizing radiation, IR) possono essere riparate da entrambi i sistemi di riparazione, mentre le rotture prodotte da un collasso della forza replicativa sono riparate principalmente, se non esclusivamente dal sistema della HR (Rothstein et al., 2000). In particolare la HR è usata per far ripartire le forche di replicazione in stallo e la riparazione dei crosslinks di DNA. La riparazione di questi ultimi coinvolge anche l'azione del complesso proteico dell'anemia di Fanconi (Fanconi anaemia protein complex, FA complex) (Kennedy e D'Andrea, 2005).

La scelta del sistema che la cellula utilizza per riparare i DSBs varia tra le diverse specie animali e tra diversi tipi cellulari, ma soprattutto è strettamente dipendente dalla fase del ciclo cellulare in cui si trova la cellula quando sopraggiunge il danno al DNA.

Nella NHEJ, i DSBs sono riconosciuti dall'eterodimero Ku70/80 che legandosi alla protein-chinasi DNA-dipendente (DNA-dependent protein Kinase catalytic subunit, DNA-PKcs), formano un complesso enzimatico, chiamato complesso della DNA-PK (DNA-PK complex), il quale recluta gli altri fattori di riparazione che processano e riuniscono il doppio filamento rotto. Esiste anche un altro meccanismo di riparazione non omologa dei DSBs chiamato ricombinazione mediata da micro-omologia (microhomology-mediated end-joining, MMEJ). Questo meccanismo, è molto meno caratterizzato rispetto agli altri due, è indipendente dall'eterodimero Ku70/80 e porta sempre ad una delezione nella sequenza da riparare (McVey e Lee, 2008).

Anche se la NHEJ e la MMEJ sono suscettibili a errori, esse possono operare in qualsiasi fase del ciclo cellulare, mentre la HR, che è priva di errori, è generalmente confinata alle fasi S e G2 del ciclo cellulare. Questo dipende dal fatto che la HR necessita della presenza del cromatidio fratello (sister cromatide) del quale sfrutta la sequenza che funge da template per re-sintetizzare la sequenza persa in seguito alla rottura dei filamenti.

Anche se esistono diversi sub-pathway di HR (San Filippo et al., 2008), generalmente essa è sempre iniziata mediante il processamento di un singolo filamento di DNA (single strand DNA, ssDNA). Tale formazione è promossa da varie proteine, incluso il complesso MRE11/RAD50/NBS1 (MRN complex, MRN). Nell'evento catalizzato da RAD51 e dalle proteine BRCA1 e BRCA2 (breast-cancer susceptibility protein, BRCA), il ssDNA invade la sequenza che funge da template e in seguito intervengono le polimerasi, nucleasi, elicasi e altre componenti che risolvono la struttura,

ricongiungendo le estremità rotte. Anche se la maggior parte dei fattori di riparazione che sono coinvolti nella HR e nella NHEJ sono esclusivi e specifici per uno dei due pathway, un certo numero di proteine è in grado di influenzare entrambi i sistemi. Tra queste proteine c'è il complesso MRN, BRCA1, l'istone H2AX, PARP1, RAD18, DNA-PKcs e ATM (Ataxia telangeectasia mutated, ATM). In particolare la DNA-PKcs, oltre a giocare un ruolo fondamentale nella NHEJ, è in grado di influenzare la HR attraverso una rete di regolazioni molto complessa che può coinvolgere anche ATM e almeno altre 12 proteine coinvolte nella HR, tutte fosforilate sia dalla DNA-PKcs che da ATM.

1.1.2 La riparazione del DNA nei neuroni

Nei neuroni operano quasi tutti i sistemi di riparazione del DNA eucariotici che sono presenti nelle cellule proliferanti. In generale, i meccanismi di riparazione NER, BER ed MMR sono stati più ampiamente descritti rispetto al sistema di riparazione NHEJ delle rotture a doppio filamento del DNA (Barzilai et al, 2008). In particolare, dal momento che è ormai noto che nei neuroni la maggior parte delle lesioni al DNA genomico e a quello mitocondriale sono inflitte principalmente dalla azione dei ROS, molti ricercatori hanno focalizzato i loro interessi sul BER, il principale sistema di riparazione coinvolto nella rimozione dei danni ossidativi in questo tipo di cellule (Fishel et al., 2007; Weissman et al., 2007; LeDoux et al., 2007; Wilson et al., 2007).

L'attività di riparazione del DNA nel sistema nervoso adulto è stata principalmente dimostrata *in vitro*, utilizzando estratti di cervello (Brooks et al., 1996; Gobbel et al., 1998; Ren e De Ortiz, 2002; Vyjayanti e Rao, 2006). Anche se da questi esperimenti è stato visto che il sistema nervoso è in grado di riparare le lesioni al DNA, esso lo fa più lentamente rispetto ai tessuti proliferanti, suggerendo che il genoma delle cellule nervose è più suscettibile all'accumulo di lesioni rispetto ad altri tessuti (McCombe et al 1976; Gobbel et al., 1998; Nospikel e Hanawalt, 2000; Nospikel e Hanawalt, 2002; McMurray 2005). Va notato inoltre che l'efficienza con cui vengono riparate le differenti lesioni al DNA varia molto da un tipo neuronale all'altro (LeDoux 2007).

In diversi studi è osservata una generale riduzione dei livelli di molte proteine della riparazione, associata al differenziamento cellulare (Tofilon and Meyn, 1988; Bill et al 1992; Nospikel e Hanawalt, 2000; Nospikel e Hanawalt, 2002). Nei neuroni, per esempio, si osserva un'attenuazione della riparazione del genoma nelle zone non trascrizionalmente attive. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che i neuroni, non replicando il loro DNA, hanno una bassa probabilità di andare incontro a lesioni/mutazioni nelle regioni del genoma non processate dal macchinario replicativo. Al contrario, nelle regioni trascrizionalmente attive si osserva una riparazione molto più efficiente (Nospikel e Hanawalt, 2000). È stato proposto che questa

selezione dei sistemi di riparo operata durante il differenziamento neuronale permetta una migliore utilizzazione delle risorse energetiche disponibili che verrebbero così convogliate in altre attività cellulari essenziali per il neurone (Nospikel 2007).

È importante sottolineare che i neuroni hanno un sistema di riparo molto efficiente nei confronti del filamento non-trascritto, un fenomeno noto come riparazione associata al differenziamento (differentiation-associated repair, DAR) o riparazione associata ai domini trascrizionali (transcription domains-associated repair, TDAR) (Nospikel 2007). Questo sistema di riparazione è probabilmente necessario per garantire la fedeltà della trascrizione, mantenendo l'integrità del filamento usato come template per il TCR (Nospikel e Hanawalt, 2002; Nospikel 2007).

Un'altra differenza importante tra i neuroni e le cellule proliferanti riguarda la riparazione dei DSBs. Infatti nei neuroni, non è presente il cromatidio fratello e quindi non è possibile utilizzare uno stampo complementare di DNA per ripristinare l'informazione persa a seguito della rottura del doppio filamento. Questa caratteristica esclude la possibilità che la rottura possa essere riparata mediante il sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HR). Dunque, l'unico sistema che sembra essere ammesso per tale tipo di rottura è quello della NHEJ. Tuttavia, è stato osservato che a seguito di un danno a doppio filamento in una popolazione di neuroni si osserva un aumento dell'espressione di proteine coinvolte sia nella NHEJ che nella HR, (Merlo et al, 2005).

Anche se la rapidità con cui viene riparato il danno al DNA può non essere cruciale per la sopravvivenza immediata del neurone, la capacità e l'efficienza di riparazione devono essere mantenute elevate per tutta la durata della vita di un organismo (McMurray 2005). L'importanza di questa caratteristica è evidenziata dallo sviluppo di malattie neurodegenerative in quei soggetti che presentano delle mutazioni nei geni della riparazione del DNA.

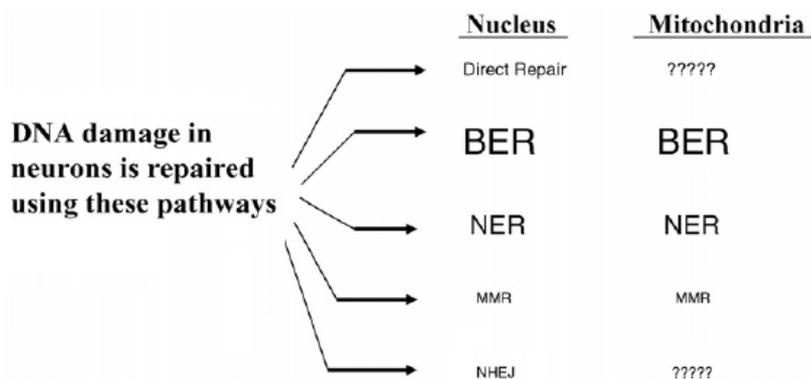


Figura 3. Schema riepilogativo dei vari sistemi di riparazione del DNA operanti nei neuroni, (tratto da Fishel et al, 2007)

1.1.3 Il sistema di riparazione della NHEJ

Il sistema di riparazione della NHEJ coinvolge primariamente cinque molecole: Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4 e la DNA ligasi IV. L'evento primario è rappresentato dall'associazione dell'eterodimero Ku70/Ku80 con la Serin/Treonin chinasi DNA-PKcs per costituire il complesso della DNA-PK. Questo complesso proteico, dopo aver riconosciuto e legato il DNA a livello del sito di rottura, è in grado di reclutare molecole addizionali coinvolte nel completamento del processo di riparazione (Meek et al., 2004). La fase iniziale del pathway prevede il riconoscimento della lesione da parte dell'eterodimero Ku70/Ku80, che rappresenta la subunità regolatoria del complesso. Essa recluta la subunità catalitica DNA-PKcs verso le estremità del DNA e ne stabilizza il legame. Ciascun eterodimero si lega alla doppia elica in modo aspecifico, posizionandosi su ciascuna estremità rotta a livello del sito danneggiato. L'associazione dell'eterodimero con la DNA-PKcs avviene quindi in una fase successiva. Inoltre, è stato osservato come l'unione di questa subunità catalitica con il DNA possa aver luogo anche senza la mediazione di Ku, sebbene con una minor efficienza (Hammarsten e Chu, 1998): Ku, infatti, aumenta l'affinità di legame della DNA-PKcs per le estremità del DNA di circa 100 volte (Koike 2002). Le due molecole di DNA-PKcs che entrano in gioco, ciascuna localizzata su una estremità del DSB, avvicinano le due parti terminali libere del DNA. La autofosforilazione in trans delle due subunità catalitiche ne induce un cambiamento conformazionale che le rende accessibili ad altre componenti del sistema di riparo.

Finora sono stati individuati 16 aminoacidi bersaglio della reazione di autofosforilazione. Tale attività è necessaria per garantire un'efficiente progressione nella NHEJ. Mutazioni in questi siti sono infatti associate a diminuzioni nell'efficienza dell'attività di riparo e rendono le cellule più sensibili all'effetto genotossico delle radiazioni ionizzanti (Collis et al., 2005).

Target dell'attività chinasi della DNA-PKcs è anche XRCC4, la cui fosforilazione ne previene il legame al DNA (Modesti et al., 1999), ma non l'interazione con la Ligasi IV, suggerendo che una delle funzioni della fosforilazione di XRCC4 sia quella di staccare XRCC4/Ligasi IV dal DNA, possibilmente dopo la riparazione del sito di rottura.

XRCC4 è una proteina di circa 37 kDa che si lega alla DNA Ligasi IV e ne stimola l'attività catalitica. Il complesso così formato, in seguito alla diretta interazione con Ku, è in grado di ravvicinare efficientemente le estremità del DNA. È stato mostrato che la DNA-PK fosforila XRCC4 in serina 53 ma questo evento non sembra precludere l'efficienza della ricombinazione V(D)J (Mizuta et al., 1997).

Sono stati postulati due modelli che illustrano due differenti strade che può seguire il complesso enzimatico della NHEJ nelle fasi terminali (Figura 4). Nella 'via classica', oltre ai cinque fattori precedentemente descritti, interviene anche Artemis, un enzima con un'attività esonucleasica 5'>3'

a singolo filamento. Una volta legato al DNA, acquisisce invece un'attività endonucleasica alle estremità 5' e 3' (Collis 2005). La sua funzione è quella di rimuovere un certo numero di nucleotidi da un singolo filamento in modo tale da generare estremità piatte che possano quindi essere facilmente ricongiunte. Mutazioni di Artemis nell'uomo si manifestano con un'aumentata radiosensibilità (RS-SCID) (Moshous et al., 2001). Le cellule difettive per Artemis sono maggiormente radiosensibili e hanno una ricombinazione V(D)J difettiva, in accordo con il ruolo che Artemis ha nello svolgere le strutture a forcina durante la ricombinazione V(D)J (Moshous et al., 2001; Rooney et al., 2002). Va precisato che le cellule deficitarie per Artemis non mancano totalmente del meccanismo di riparazione dei DSB, anche se esso risulta meno efficiente (Riballo et al., 2004).

Il processamento delle estremità prima del loro ricongiungimento può essere anche conseguito grazie all'intervento di specifiche Polimerasi, come la DNA polimerasi λ (Lee et al. 2004) o la DNA polimerasi μ (Mahajan et al., 2002), che in alternativa all'azione di Artemis, sono in grado di promuovere la reazione di allungamento del singolo filamento (Weterings e Chen, 2008). Il legame successivo tra le estremità del DNA è mediato dal complesso tetramerico ligasi IV/XRCC4, che interagisce con la DNA-PK e opera la giunzione. In una via alternativa, che ha luogo quando esistono regioni di micro-omologia tra le estremità rotte, i complessi ligasi IV/XRCC4 e XLF/Cernunnos intervengono subito dopo l'autofosforilazione della DNA-PKcs, favorendo il ricongiungimento delle due estremità libere di uno stesso filamento, mentre nel filamento opposto la Polimerasi inserisce unità nucleotidiche. In questa via, nel cui step finale partecipa nuovamente il complesso Ligasi IV/XRCC4, il meccanismo di riparo del DNA introduce un numero minore di errori.

Il ruolo centrale nella NHEJ è svolto dal complesso della DNA-PK. Esso non solo agisce da impalcatura proteica necessaria alla corretta giustapposizione delle componenti enzimatiche sul DNA, ma funziona anche da attivatore molecolare. Infatti, è stato mostrato come la DNA-PK sia in grado di fosforilare cinque dei sei fattori della via del NHEJ: Ku70, Ku80, XRCC4, Artemis e la DNA-PKcs stessa (Meek et al., 2004). Analisi strutturali della DNA-PKcs hanno rivelato l'induzione di cambiamenti conformazionali in questa proteina, in seguito alla sua associazione con il DNA. Quando non è legata, sono ben visibili due domini globulari separati da un piccolo braccio. L'interazione con il DNA è causa di un'alterazione strutturale che porta i domini di ciascuna molecola in intimo contatto, creando uno stretto canale dove si vanno a collocare le estremità del DNA. Alcuni autori usano riferirsi a tale organizzazione con il termine di 'sinapsi' (Boskovic et al., 2003). È stato pertanto ipotizzato che il meccanismo di funzionamento della DNA-PKcs includa una vera e propria internalizzazione della doppia elica. Inoltre, è probabile che sia l'interazione in

trans proteina-proteina, sia il legame della DNA-PKcs con il DNA e con Ku siano eventi assolutamente necessari per l'attivazione della attività chinastica (Meek et al., 2004).

Altro elemento chiave della NHEJ è Ku, un eterodimero nucleare costituito da due subunità proteiche di circa 70 ed 80 kDa, designate appunto Ku70 e Ku80 (o Ku86). Ogni componente è in grado di traslocare dal citosol, nel quale è sintetizzata, verso il nucleo non solo grazie ad un segnale di localizzazione nucleare, ma anche attraverso la formazione di un dimero con l'altra subunità (Lee e Kim, 2002). L'eterodimerizzazione è perciò essenziale soprattutto per l'attività di riparo non omologa, in quanto stabilizza queste singole componenti (Koike 2002), le quali, nonostante abbiano una scarsa omologia di sequenza (~15%), mostrano una struttura tridimensionale estremamente somigliante (Jones et al., 2001). Una volta assemblato, l'eterodimero si organizza a formare una struttura ad anello che andrà a circondare la doppia elica nel punto opportuno (Figura 4).

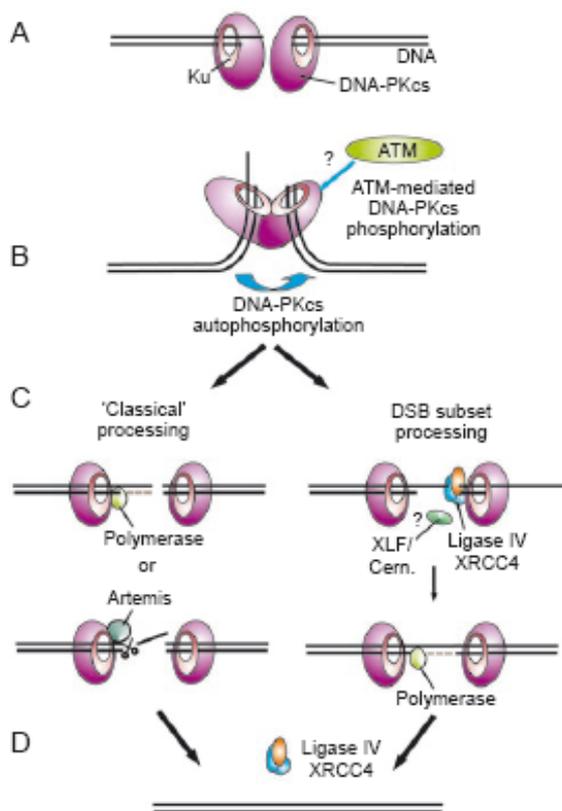


Figura 4. Modello della NHEJ. (A) L'eterodimero Ku70/Ku80 si associa alle estremità del DNA generate dalla rottura. L'impalcatura Ku-DNA recluta la DNA-PKcs, formando due complessi DNA-PK, ciascuno posto ad un'estremità. (B) Le molecole di DNA-PKcs avvicinano le parti terminali del DNA formando con esse una struttura definita 'sinapsi'. L'autofosforilazione della DNA-PKcs introduce cambiamenti conformazionali che la rendono accessibile ad altre proteine. (C) Se la lesione nel DNA ha prodotto estremità asimmetriche, la NHEJ segue una 'via classica', in cui le parti terminali del DNA vengono processate, dalla Polimerasi o da Artemis, prima di essere ricongiunte dal complesso Ligasi IV/XRCC4 (in basso a sinistra). In una via alternativa, che ha luogo quando il taglio nella doppia elica ha prodotto estremità simmetriche che mostrano regioni di micro-omologia, i complessi ligasi IV/XRCC4 e XLF/Cernunos intervengono subito dopo

l'autofosforilazione della DNA-PKcs, favorendo il ricongiungimento delle due estremità libere di uno stesso filamento, mentre nel filamento opposto la Polimerasi (in basso a destra) inserisce unità nucleotidiche. Nello step finale di questa via partecipa nuovamente il complesso Ligasi IV/XRCC4 che va a risaldare le estremità separate dalla rottura. (D) La struttura del doppio filamento è ripristinata.

1.1.4 Il complesso della DNA-PK

Il complesso della DNA-PK è un etero-trimero costituito da una subunità catalitica nota come DNA-PKcs e da una subunità regolatoria, nota come Ku70/80 (Dip e Naegeli, 2005). Questo complesso svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità genomica grazie alla sua capacità di riparare i DSBs.

Dato che i DSBs sono anche prodotti nella ricombinazione $V(D)J$ che sta alla base del riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline e dei recettori T, essa assume un ruolo essenziale nello sviluppo del sistema immunitario (Collis et al., 2005).

Oltre a queste funzioni fondamentali per la vitalità cellulare, il complesso della DNA-PK svolge anche altre funzioni importanti come ad esempio la trasduzione del segnale innescata dal danno al DNA, il mantenimento della stabilità dei telomeri (Boulton SJ e Jackson SP, 1998; Espejel et al., 2004), il controllo dell'apoptosi ed è stato recentemente coinvolto nella regolazione della trascrizione geni della lipogenesi (Wong et al., 2009). Date le sue funzioni strettamente correlate al DNA, la sua localizzazione all'interno della cellula è prevalentemente nucleare, ma è ormai noto che le due subunità del complesso sono presenti anche in altri compartimenti cellulari, quali il citoplasma e la membrana plasmatica, e che esso è in grado di traslocare da un compartimento all'altro in seguito a diversi stimoli (Huston et al., 2008).

La subunità catalitica DNA-PKcs è codificata dal gene PRKDC situato sul cromosoma 8q11 ed è costituito da 86 esoni. Questo gene possiede una struttura molto complessa che riflette non solo le grandi dimensioni della proteina, ma anche la molteplicità di ruoli funzionali che svolge all'interno della cellula.

Il clonaggio del cDNA della DNA-PKcs ha rivelato che essa è un polipeptide di ~470kDa, la porzione ammino-terminale (~3500aa) della proteina non sembra mostrare una omologia significativa con altre proteine, mentre la porzione carbossi-terminale (~500aa) include un dominio catalitico che appartiene ai membri della famiglia delle chinasi correlate alle fosfatidilinositolo-3-chinasi (*phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases*, PIKK). Questo dominio catalitico è stato trovato in proteine che partecipano a diversi processi cellulari, come la regolazione del ciclo cellulare, la risposta al danno al DNA, la ricombinazione $V(D)J$ dei geni delle immunoglobuline e di quelli dei recettori TCR dei linfociti T. Il malfunzionamento di questo dominio può causare diverse malattie, tra cui immunodeficienza, disordini neurologici, invecchiamento precoce e lo sviluppo di tumori. Nonostante la presenza di questa regione di omologia, la DNA-PKcs presenta delle caratteristiche che la rendono differente rispetto agli altri membri di questa famiglia. Per esempio essa non è in grado di fosforilare i fosfolipidi e non è molto conservata nel regno animale. La sua espressione è infatti riscontrabile solamente negli eucarioti superiori e non nel genoma di

eucarioti inferiori come *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila* (Hartley et al., 1995).

Sempre nella regione carbossi-terminale sono presenti altre due regioni che fiancheggiano il dominio PIKK, una nota come dominio FAT e l'altra nota come dominio FATC. Queste due regioni prendono il nome dalle iniziali di tre proteine in cui essa è presente (FRAP, ATM e TRRAP). Anche se non è nota la reale funzione di questi due domini, è stato suggerito che, dato che essi sono sempre presenti in combinazione tra loro, la loro interazione sia necessaria per regolare l'attività chinasi del dominio PIKK (Rivera-Calzada et al., 2005).

L'analisi della struttura tridimensionale della DNA-PKcs ha rivelato che essa possiede una parte superiore a forma di corona separata da un fondo arrotondato, suggerendo che essa sia in grado di ospitare la doppia elica del DNA al suo interno (Leuther et al., 1999; Boskovic et al., 2003; Spagnolo et al., 2006). Oltre alla presenza di questi domini conservati, la DNA-PKcs mostra la presenza di diversi siti di interazione con altre proteine e molti siti di auto-fosforilazione (Spagnolo et al., 2006).

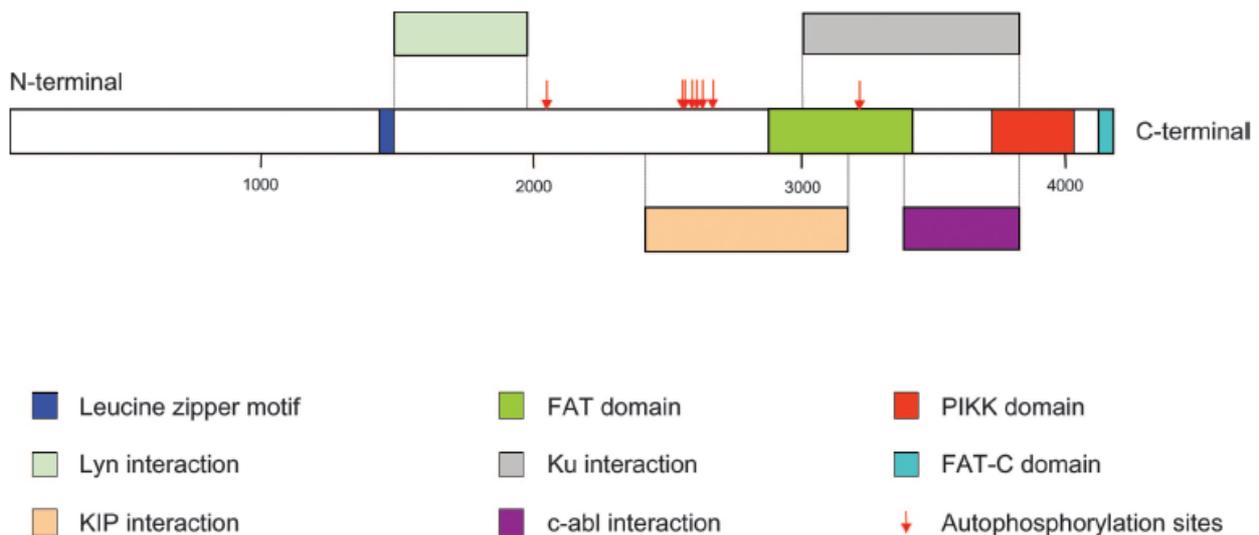


Figura 5. Rappresentazione schematica della proteina DNA-PKcs.

La subunità catalitica DNA-PKcs presenta attività serina/treonina-chinasi e viene generalmente attivata in presenza di estremità libere di DNA a doppio filamento, come quelle presenti nei DSBs. È importante notare però che questo enzima è in grado di attivarsi anche in assenza di DSBs (Yavuzer et al., 1998). È stato inoltre osservato che, benché la DNA-PKcs si attivi legandosi al

complesso Ku70/80-DNA, essa è anche in grado di farlo in presenza del solo DNA (Gottlieb e Jackson, 1993; Hammarsten e Chu, 1998).

La subunità catalitica della DNA-PK fosforila Ku 70 in serina 6 e Ku 80 in serina 577 e 580, e probabilmente in serina 579 e treonina 715 (Cha et al., 1999).

E' stato inoltre riportato che la subunità catalitica DNA-PKcs fosforila Ku70 in serina 51, ma questa fosforilazione non influenza la capacità di riparare il danno indotto da radiazioni (Jin e Weaver, 1997). Benché sia stato suggerito che le regioni fosforilate di Ku siano importanti per l'interazione e il legame con il DNA (Wu e Lieber, 1996), il legame di Ku alle estremità libere del DNA non sembra essere influenzato dalla fosforilazione (Chan e Lees-Miller, 1996).

Per quanto riguarda la distribuzione intracellulare del complesso della DNA-PK è interessante sottolineare che, oltre alla tipica localizzazione nucleare, è stato osservato che tutte e tre le componenti del complesso sono associate ai *raft* lipidici in diverse linee cellulari di mammifero e che questa non è una caratteristica comune ad altri fattori di riparo coinvolti nella NHEJ. Generalmente l'assemblaggio del complesso della DNA-PK avviene in seguito ad una rottura a doppio filamento del DNA e quest'ultimo è necessario alla sua attivazione. In questo lavoro (Lucero et al., 2003) gli autori hanno dimostrato che la mancanza di uno dei componenti del complesso o l'assenza di DNA non preclude la localizzazione in membrana delle altre subunità. Questo dato suggerisce che non è necessario un pre-assemblaggio del complesso per permettere la sua interazione con proteine presenti a livello della membrana plasmatica. Inoltre, a seguito dell'immunoprecipitazione di Ku86 dai *raft* lipidici solo Ku70 è risultata co-immunoprecipitare con esso, mentre la DNA-PKcs no. È dunque ancora poco chiaro se le subunità del complesso interagiscano direttamente tra loro e cooperino funzionalmente o se semplicemente coesistano nei *raft* lipidici svolgendo funzioni tra loro non correlate.

Circa la capacità del complesso della DNA-PK di essere reclutato in membrana, gli autori hanno proposto diverse spiegazioni: una di queste è che il complesso resti ancorato alla membrana in modo permanente e solamente dopo un particolare stimolo venga assemblato e attivato a livello dei *raft* lipidici. Un'altra possibilità è che la DNA-PKcs e l'eterodimero Ku70/Ku80 svolgano ruoli completamente indipendenti tra loro e che la loro attivazione sia legata alla specificità dello stimolo che ricevono.

Anche se il meccanismo di attivazione della DNA-PKcs nei *raft* lipidici deve essere ancora ben definito, recenti evidenze hanno mostrato che la sua attività chinasi può essere stimolata anche in assenza di DNA, dall'interazione con la proteina legante il recettore dell'ormone tiroideo (Ko e Chin, 2003) o la proteina KIP/C1B (Yavuzer et al., 1998).

Inoltre è stato evidenziato che tutte e tre le subunità del complesso della DNA-PK presentano all'interno della loro sequenza amminoacidica alcuni "PDZ-binding domain", ovvero specifiche sequenze consensus per il dominio PDZ di altre proteine. E' interessante sottolineare che proprio la DNA-PKcs presenta nella porzione C-terminale della sequenza amminoacidica il caratteristico dominio ESKV con cui può interagire ai domini PDZ di proteine bersaglio (Hu et al., 2003; HE et al., 2004).

1.2 LA RIPARAZIONE DEL DNA NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Mutazioni di geni coinvolti nella riparazione del DNA possono portare allo sviluppo di patologie umane caratterizzate da una pronunciata neuropatologia. In molte di queste sindromi la componente neurologica rappresenta l'aspetto più deleterio della malattia (Tabella 2). In particolare la deficienza dei sistemi di riparo può condurre a neurodegenerazione, microcefalia e tumori cerebrali.

Tabella 2. Patologie neurodegenerative causate da compromissione dei sistemi di riparazione del DNA (Tratto da McKinnon 2009)

Disease or syndrome	Gene	Neurological symptoms	Extraneurological symptoms
<i>DNA DSB repair deficiency</i>			
Ataxia telangiectasia	ATM	Ataxia, neurodegeneration, telangiectasia and dysarthria	Immunological defects, malignancy and sterility
Ataxia telangiectasia-like disorder	MRE11	Ataxia, neurodegeneration, dysarthria and oculomotor apraxia	Mild immunological defects
Nijmegen breakage syndrome	NBS1	Microcephaly	Immunological defects and lymphoid malignancy
ATR-Seckel syndrome	ATR	Microcephaly and mental retardation	Growth defects
LIG4 syndrome	LIG4	Microcephaly	Developmental/growth delay, immunodeficiency and lymphoma
Human immunodeficiency with microcephaly	Cernunnos	Microcephaly	Immunodeficiency
Fanconi anaemia	BRCA2	Microcephaly and medulloblastoma	Bone marrow and congenital defects
<i>DNA SSB repair deficiency</i>			
Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy	TDP1	Ataxia, neurodegeneration, peripheral axonal motor and sensory neuropathy, and muscle weakness	Hypercholesterolaemia and hypoalbuminaemia
Ataxia with oculomotor apraxia 1	APTX	Ataxia, neurodegeneration, oculomotor apraxia and peripheral neuropathy	Hypercholesterolaemia and hypoalbuminaemia
<i>NER deficiency</i>			
Xeroderma pigmentosum	XPA-XPG	Neurodegeneration and microcephaly	UV sensitivity and skin cancer
Cockayne syndrome	CSA, CSB, XPB, XPD and XPG	Microcephaly and dysmyelination	Progeria and otherwise variable presentation
Trichothiodystrophy	XPD, XPB and TTD-A	Neurodevelopmental defects and dysmyelination	Brittle hair and otherwise variable presentation
<i>DNA cross link repair</i>			
Fanconi anaemia	FAA-FAL	Microcephaly and medulloblastoma (brain tumours in FANCD2 and FANCN subtypes)	Anaemia, developmental defects and cancer
<i>Helicase deficiency</i>			
Werner syndrome	WRN	?	Severe progeria and cancer
Rothmund Thomson syndrome	RTS	?	Cancer
Bloom syndrome	BLM	?	Proportional dwarfism and cancer
Ataxia with oculomotor apraxia 2	SETX	Ataxia, neurodegeneration and oculomotor apraxia	Absent or minimal

Le malattie neurodegenerative possono essere classificate in base a diversi criteri, inclusi l'età di comparsa della malattia, l'esistenza di una base genetica e le caratteristiche cliniche e/o biologiche. Tipicamente, sono considerate croniche e associate all'età senile malattie neurodegenerative come le forme sporadiche di malattia di Alzheimer e di malattia di Parkinson, mentre hanno una comparsa molto precoce ed una manifestazione acuta disordini monogenici come le sindromi di instabilità genomica (tabella 2), quali ad esempio l'Atassia Telangiectasia, la sindrome di Cockayne, lo Xeroderma Pigmentoso. Esistono dei dominatori comuni tra questi due gruppi di malattie e l'accumulo di danni al DNA è certamente uno di questi (Robbins 1987; Itzhaki 1994; Cotman e Su, 1996; Rutten et al., 2003; Halliwell 2006; Fishel et al, 2007; Rutten et al., 2007). È importante sottolineare però che mentre nelle prime non è possibile stabilire con certezza se la compromissione dei sistemi di riparazione al DNA e il conseguente accumulo di lesioni sia una causa o una conseguenza del processo neurodegenerativo, nelle seconde esiste una relazione causale precisa che lega la compromissione dei sistemi di riparazione alla neurodegenerazione.

In generale, è ragionevole ipotizzare che la compromissione della risposta al danno al DNA giochi un ruolo di primo piano nel processo neurodegenerativo e più in generale nel processo di invecchiamento neuronale (Kirkwood e Austad, 2000; Rolig e McKinnon, 2000; Korr et al., 2001; Halliwell 2006; Ito et al., 2007; Barzilai 2007; Fishel et al, 2007; Weissman et al., 2007; Rutten et al., 2007).

Uno dei fattori maggiormente associati alle forme sporadiche di malattie neurodegenerative è sicuramente lo stress ossidativo. A causa dell'alto tasso metabolico e della ridotta capacità rigenerativa, il tessuto cerebrale è considerato molto più suscettibile all'azione dei ROS rispetto ad altri tessuti. Molti lavori hanno mostrato molto chiaramente che tessuti cerebrali provenienti da pazienti affetti da malattie quali il Parkinson e l'Alzheimer, mostrano un significativo aumento dell'indice dei ROS nelle aree cerebrali maggiormente colpite da neurodegenerazione. In particolare, la suscettibilità al danno genotossico associata al processo neurodegenerativo e di invecchiamento non è uniforme in tutto il sistema nervoso (Morrison e Hof, 2002): esistono infatti differenze sostanziali nell'accumulo di lesioni al DNA nelle diverse aree cerebrali e nei diversi tipi di cellule nervose (Rutten et al, 2003).

Un elemento che rende particolarmente difficile la comprensione dei meccanismi alla base della neurodegenerazione è il fatto che lo stress ossidativo è in grado di danneggiare contemporaneamente tutte e tre le principali costituenti cellulari, le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici. Questo fatto introduce un elemento di complessità e cioè il fatto che i ROS da una parte possono causare specifiche lesioni al materiale genetico come SSBs e DSBs e parallelamente

possono agire danneggiando i sistemi di riparazione del DNA. Per esempio nella malattia di Alzheimer, si è osservato la contemporanea presenza di entrambi i tipi di rotture al DNA e la compromissione dei sistemi di riparazione del BER, MMR e della NHEJ.

Sfortunatamente, è molto difficile stabilire una relazione causale *in vivo* tra stress ossidativo, danno al DNA e neurodegenerazione.

Tabella 3. Alterazioni dei sistemi di riparazione al DNA associate alle malattie di Alzheimer e Parkinson (modificato da Barzilai et al., 2009)

Syndrome	Affected brain areas	Neurological symptoms	Alterations in DDR pathways and processes
Parkinson's disease (PD)	Substantia nigra pars compacta	Dopaminergic cell loss; tremor; bradykinesia; postural rigidity and instability	Increased oxidative stress and DNA damage; activation of mitochondrial BER
Alzheimer's disease (AD)	Cerebral cortex	Progressive neurodegeneration and dementia; memory loss and cognitive decline	Increased oxidative stress; accumulation of oxidative damage; reduced NHEJ; accumulation of DSBs and SSBs; reduction in MRN complex components; activation of cell cycle program

1.2.1 Il danno al DNA nella malattia di Alzheimer e il ruolo del peptide β -amiloide

Diversi studi sono stati condotti per indagare la natura del danno al DNA nella malattia di Alzheimer. Molti di questi studi, basati su metodi biochimici, hanno fornito un'indicazione sull'indice globale del danno (Su et al., 1994; Lassmann et al., 1995; Smale et al., 1995; Lucassen et al., 1997; Stadelmann et al., 1998). Meno numerosi sono gli studi che hanno caratterizzato la natura specifica del danno al DNA a livello di singole cellule.

Tra questi è importante citare un lavoro condotto utilizzando metodi di ibridazione in situ su cellule di diverse aree dell'ippocampo, una regione profondamente colpita nell'AD; sono state analizzate diverse sezioni prelevate da cervelli AD postmortem ed è stata evidenziata la presenza simultanea di SSBs e DSBs all'interno delle stesse cellule (Adamec et al., 1999).

Va notato che questo tipo di rotture non è sempre accompagnato da marker apoptotici, escludendo che tali lesioni non siano quelle associate alla frammentazione del DNA che si verifica durante l'apoptosi (Stadelmann et al., 1998).

I ROS sono in grado di produrre diversi tipi di danno al DNA, tra cui modificazioni delle basi azotate, rotture a singolo filamento e rotture a doppio filamento. In particolare queste ultime si formano generalmente, come conseguenza di SSBs poste in stretta vicinanza tra loro o non riparate correttamente.

Diversi studi hanno mostrato che alterazioni della funzionalità mitocondriale possono essere messe in relazione con molte patologie neurodegenerative. In particolare, nei soggetti colpiti da AD si è misurata una diminuzione del 25-30% dell'attività della citocromo ossidasi in diverse aree cerebrali (Mutysia et al., 1994); un calo del 50% è stato invece riscontrato in mitocondri purificati da tessuto cerebrale di pazienti AD. È interessante notare che la riduzione dell'attività della citocromo ossidasi è stata osservata anche in fibroblasti di pazienti affetti da AD (Curti et al., 1997).

Come detto in precedenza, tra gli effetti dello stress ossidativo, forse il più pericoloso è rappresentato dalle modificazioni ossidative a carico degli acidi nucleici. Un crescente numero di evidenze sperimentali hanno messo in luce una forte associazione tra l'accumulo di danno ossidativo al DNA e la progressione della malattia di Alzheimer. L'analisi condotta sul DNA nucleare estratto da aree cerebrali di pazienti AD postmortem, ha evidenziato la presenza di livelli significativi di diverse basi azotate modificate tra cui la 8-idrossi-guanina(8oxoG) , 8-idrossi-adenina(8oxoA), FapyG, FapyA (Gabbita et al., 1998). Inoltre sono state riscontrate alte concentrazioni di purine e pirimidine ossidate nel DNA estratto da linfociti e leucociti (Mecocci et al., 1998; Morocz et al., 2002; Kadioglu et al., 2004; Mighore et al., 2005) e dal liquido cerebrospinale (Lovell et al., 1999) di pazienti AD.

Recenti evidenze hanno indicato un danno ossidativo in tessuti cerebrali (Wang et al., 2006) e leucociti (Migliore et al., 2005) di individui affetti da deficit cognitivo lieve (mild cognitive impairment, MCI), una forma di demenza associata all'invecchiamento e che sembra essere una fase molto precoce nello sviluppo della patologia di AD. Questo dato suggerisce che l'ossidazione del DNA può essere considerato un evento molto precoce nella progressione della malattia, addirittura precedente lo sviluppo delle altre alterazioni citologiche tipiche dell'AD.

Nonostante gli elevati livelli di DNA nucleare ossidato riscontrabili nell'AD, numerosi studi hanno mostrato che in il DNA mitocondriale può contenere una quantità da tre a dieci volte maggiore di basi ossidate rispetto al DNA nucleare (Mullaart et al., 1990; de la Monte et al., 2000; Mecocci et al., 1994; Wang et al., 2006). Differenze sostanziali sono state trovate anche nella distribuzione del danno al DNA in diverse aree cerebrali; regioni neocorticali hanno livelli più elevati di danno ossidativo al DNA sia mitocondriale che nucleare rispetto al cervelletto (Gabbita et al., 1998).

Tra le varie ipotesi proposte per spiegare il fenotipo neuropatologico della malattia di Alzheimer, l'ipotesi della "cascata amiloidogena" suggerisce che la patologia sia innescata da un'alterazione

dell'espressione o del processamento della proteina precursore dell'amiloide APP, che conduce ad un accumulo di peptide β -amiloide ($A\beta$) in determinate aree cerebrali. Infatti, malgrado sia stato dimostrato che il rilascio di $A\beta$ dai neuroni sia un normale processo fisiologico (Shoji et al., 1992), nell'AD si riscontra un atipico accumulo del peptide in depositi extraneuronali, o placche senili.

Nonostante i depositi extracellulari di $A\beta$ siano ormai ufficialmente considerati marcatori patogenetici della malattia di Alzheimer, alcuni studi hanno messo in evidenza che anche a livello intraneuronale ci sia un caratteristico accumulo del peptide e che questo possa giocare un ruolo patofisiologico importante per la progressione della malattia. In lavori condotti su tessuti cerebrali di pazienti affetti da Sindrome di Down, è stato osservato che la deposizione intracellulare di $A\beta$ ($A\beta_i$) è un evento precoce nella malattia e precede la formazione delle placche extra-cellulari. Infatti, i livelli intraneuronali di $A\beta$ diminuiscono parallelamente ad un loro aumento nello spazio extracellulare (Mori et al., 2002). Questa relazione inversa tra accumulo di $A\beta$ intra ed extracellulare è stato anche confermato da studi condotti su un modello transgenico triplo, sovraesprimente sia il gene APP^{swe}, che Tau P301L e PS1 M146V (Oddo et al., 2003). Questi risultati sottolineano dunque la presenza di un equilibrio dinamico tra i due tipi di depositi (Oddo et al., 2006).

Anche se è ancora materia di controversie, alcuni autori hanno ipotizzato che a causare il danno ossidativo sia l'accumulo di peptide $A\beta$ in forma oligomerica (Walsh e Selkoe, 2007). Questa ipotesi è sostenuta da alcuni lavori in cui è stato osservato che $A\beta$ oligomerica è in grado di generare direttamente perossido di idrogeno (H_2O_2) attraverso la riduzione degli ioni ferro e rame (Huang et al., 1999; Opazo et al., 2002) e causare la perdita del potenziale di membrana mitocondriale in astrociti tramite l'attivazione della nicotinammin-adenin-dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi (Abramov et al., 2004). Inoltre è stato anche dimostrato che cellule PC12 esprimenti un precursore mutato dell'amiloide (APP^{SWE} -K670M/N671L), esprimono elevati livelli di ossido nitrico accompagnati da una diminuzione dell'attività della citocromo C ossidasi e una riduzione dei livelli di ATP (Keil et al., 2004a,b).

Diversi lavori condotti su culture primarie di neuroni hanno evidenziato il legame tra peptide $A\beta$ e danno al DNA; in particolare, è stato osservato che l' $A\beta$ è in grado di aumentare la suscettibilità al danno al DNA e all'apoptosi, da parte dell'acido folico e dell'omocisteina (Kruman et al., 2002). Inoltre, sempre utilizzando colture primarie di neuroni, è stato dimostrato che il trattamento con il peptide $A\beta$ è in grado di produrre rotture al DNA sia a singolo che a doppio filamento e che l'assenza di ATM blocca completamente l'apoptosi indotta da tali rotture (Kruman et al., 2004). Questo dato ha spinto a ipotizzare che il meccanismo alla base del processo neurodegenerativo che si osserva in AD sia in parte dovuto al danno al DNA prodotto dall'azione genotossica di $A\beta$.

In cellule NT2 è stato dimostrato che il peptide A β (25-35) è in grado di indurre una rapida espressione del gene gadd45, coinvolto nel sistema di riparazione per escissione nucleotidica, indicando che il danno al DNA possa essere un evento critico e molto precoce nella tossicità indotta da A β (Santiard-Baron et al., 2001). Infine molto recentemente è stato dimostrato *in vitro* che il peptide A β (1-42) possiede proprietà endonucleasiche e che quindi è in grado di tagliare direttamente il DNA senza la mediazione dello stress ossidativo (Suram et al., 2007).

1.2.2 Deficit dei sistemi di riparazione del DNA nella malattia di Alzheimer

L'accumulo di danni al DNA associato ad AD descritto finora ha posto la questione se anche i sistemi di riparazione del DNA siano compromessi nella malattia. Molti lavori sono stati condotti negli ultimi anni per testare questa ipotesi, ma spesso si è arrivati a conclusioni contrastanti (Robbins et al., 1985; Scudiero et al., 1986; Robison et al., 1987; Kinsella et al., 1987; Edwards et al., 1989; Jones et al., 1989; Parshad et al., 1996).

In particolare, in uno studio condotto su fibroblasti di individui sani e individui AD è stata confrontata l'efficienza di riparazione del sistema TCR, nei confronti di uno specifico danno al gene della diidrofolato reduttasi (dihydrofolate reductase, DHFR). Il risultato è stato che entrambe le popolazioni sono ugualmente efficienti nel riparare il danno. Questa osservazione ha escluso che il sistema di riparazione TCR sia compromesso dalla malattia, o almeno non nel sistema cellulare analizzato (Link et al., 1995).

Altri studi sono stati condotti focalizzando l'attenzione sulla risposta al danno al DNA, valutando differenze nella espressione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale conseguente alla lesione al DNA. Utilizzando cellule neuronali umane prelevate da individui sani e pazienti AD, sono stati misurati i livelli proteici della poli-ADP-ribosio polimerasi (Poly-ADP-ribose polymerase, PARP), un enzima attivato dalla presenza di SSBs e DSBs, in grado di promuoverne la riparazione. I risultati hanno mostrato che i pazienti AD hanno livelli molto più elevati di PARP rispetto agli individui sani (Love et al., 1999). In un altro lavoro è stato misurato il livello di espressione delle proteine del complesso MRN (RAD50-MRE11-NBS1), essenziale per il riconoscimento del danno e la trasduzione del segnale da esso innescata. Da questo studio è emerso che tutte e tre le componenti del complesso erano sostanzialmente ridotte nei neuroni prelevati dalle aree corticali dei pazienti AD analizzati (Jacobsen et al., 2004).

Una crescente mole di lavori evidenzia l'accumulo di danno ossidativo al DNA nei cervelli AD, ma solamente pochi studi sono stati condotti per esaminare se siano presenti alterazioni del sistema di riparazione BER. In uno di questi studi è stata valutata l'espressione di APE1, una endonucleasi

coinvolta nei primi stadi di riparazione del BER. Tale espressione è risultata aumentata in estratti di corteccia AD confrontata con i controlli sani (Davydov et al., 2003). È curioso notare che in un altro studio, è stata visualizzata la presenza di APE1 all'interno delle placche senili e nelle regioni maggiormente colpite da neurodegenerazione (Tan et al., 1998).

L'attività di OGG1, il primo enzima responsabile della rimozione delle guanine ossidate (8-oxoG), è molto ridotta in estratti nucleari preparati a partire da diverse aree dell'ippocampo e della corteccia provenienti da pazienti AD (Lovell et al., 2000). Inoltre l'espressione di β -OGG1, la variante mitocondriale della proteina OGG1, risulta essere ridotta nel citoplasma dei neuroni della corteccia entorinale e del giro orbitofrontale ed è risultata associata ai grovigli neurofibrillari (neurofibrillary tangles, NFTs), ai neuriti distrofici e agli astrociti reattivi presenti in cervelli di soggetti AD (Iida et al., 2002).

In uno studio svolto su pazienti con AD e pazienti affetti da MCI è stata osservata una significativa riduzione dell'efficienza del sistema di riparazione BER rispetto ai controlli. Gli stessi autori hanno poi condotto uno studio per cercare una associazione tra l'alterazione del BER e la comparsa dei sintomi della malattia. Per questo lavoro è stato utilizzato un modello murino transgenico di malattia di Alzheimer, che porta mutazioni sui geni dell'APP, PS1 e Tau. Sorprendentemente i risultati ottenuti hanno mostrato che, a differenza dell'uomo, lo sviluppo della patologia AD nel modello murino analizzato, non è associata ad una deficienza del sistema di riparazione BER (Weissman et al., 2009).

Dal momento che i neuroni post-mitotici utilizzano esclusivamente la NHEJ per riparare i DSBs, alcuni studi hanno ricercato la presenza di un qualche tipo di legame tra questo sistema di riparo e la patogenesi di AD. Uno studio condotto su estratti nucleari di corteccia prefrontale di soggetti AD ha mostrato una significativa diminuzione della capacità di end-joining da parte del sistema NHEJ rispetto a quella riscontrata in soggetti sani. Inoltre, a questa diminuzione è stata anche associata una riduzione dei livelli proteici della DNA-PKcs, la porzione catalitica del complesso responsabile della NHEJ (Shackelford 2006). Questi dati suggeriscono che la capacità di riparo dei DSBs, può essere seriamente compromessa in AD. Il legame tra neurodegenerazione e DSBs è rafforzata da studi condotti su cellule derivanti da topi SCID (Severe Combined Immuno-Deficiency). Questi topi sono maggiormente sensibili alle radiazioni ionizzanti in quanto non sono in grado di riparare i DSBs mediante il sistema della NHEJ. Diversi studi hanno mostrato come questa incapacità dipenda dalla presenza di una mutazione nel gene *prkdc* codificante la subunità catalitica del complesso della DNA-PK. Questa mutazione comporta la traduzione di una proteina troncata nella porzione C-terminale e priva di attività chinasi. I neuroni dei topi SCID mostrano inoltre un aumento spontaneo della morte cellulare ed un incremento della suscettibilità allo stress ossidativo

ed a stimoli genotossici ed eccitotossici (Culmsee et al., 2001). In particolare, colture neuronali preparate da questi topi sono più sensibili allo stress ossidativo indotto da β -amiloide e da eccitotossicità da glutammato (Culmsee et al., 2001). Da qui è stato quindi ipotizzato che la ridotta espressione della DNA-PKcs e la ridotta capacità di NHEJ possa rendere i neuroni più vulnerabili al danno ossidativo indotto dalla deposizione di peptide amiloide o altri agenti genotossici, rendendoli suscettibili alla neurodegenerazione caratteristica di AD (Shaekelford 2006).

2.OBIETTIVI DELLA RICERCA

Sebbene l'accumulo del danno al DNA rappresenti un comune denominatore per molte malattie neurodegenerative (Barzilai et al., 2008; McKinnon, 2009), non è stata ancora definita una relazione causale tra compromissione dei sistemi di riparazione e neurodegenerazione per quelle patologie non causate da mutazioni di geni coinvolti nei sistemi di riparazione del DNA.

Nella malattia di Alzheimer è stata osservata la compromissione di diversi sistemi di riparazione, tra i quali la NHEJ. Uno studio precedente condotto utilizzando estratti cellulari provenienti da corteccia medio-frontale di pazienti AD postmortem, ha evidenziato una ridotta capacità di DNA 'end-joining' *in vitro* associata a bassi livelli proteici della subunità catalitica del complesso della DNA-PK (Shackelford, 2006). Tuttavia, non è ancora chiaro quale fattore associato alla malattia sia il responsabile di tali alterazioni e quale sia il meccanismo molecolare che ne sta alla base.

Primo obiettivo di questa tesi è stato quello di stabilire se esistesse una relazione causale tra la beta amiloide, principale mediatore della degenerazione neuronale caratteristica di AD secondo l'ipotesi della cascata amiloidogenica, e l'alterazione dell'attività del complesso della DNA-PK. Abbiamo inoltre cercato di identificare il meccanismo molecolare alla base di tali alterazioni.

Sebbene il complesso della DNA-PK sia stato individuato principalmente nel compartimento nucleare, è stato dimostrato (Lucero et al. 2003) che tutte e tre le componenti sono associate ai raft lipidici, microdomini essenziali nel differenziamento neuronale e nella modulazione della trasmissione sinaptica. Questa evidenza, insieme alla dimostrazione che la sua attività chinasi può essere stimolata anche in assenza di DNA, suggerisce la possibilità che la DNA-PK nei neuroni possa giocare anche un ruolo diverso da quello della riparazione del danno al DNA.

Pertanto, secondo obiettivo della tesi è stato quello di individuare la localizzazione della DNA-PKcs nelle membrane sinaptiche, verificare la presenza di attività chinasi al di fuori del compartimento nucleare e la sua eventuale interazione con proteine coinvolte nella plasticità sinaptica, quali i recettori NMDA, i recettori AMPA e la proteina PSD 95.

Infine, come terzo obiettivo, abbiamo valutato un possibile ruolo della DNA-PKcs nella plasticità sinaptica, analizzando la facilitazione sinaptica e il potenziamento a lungo termine in topi deficitari per l'attività chinasi della DNA-PKcs (topi scid).

3.MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Peptide A β (25-35, 35-25, 1-42, 42-1) (Bachem); i peptidi A β (25-35) e A β (35-25) sono stati sciolti in acqua e sono stati fatti aggregare per 7 giorni a 37°C, mantenendoli in costante agitazione, mentre i peptidi A β (1-42) e A β (42-1) sono stati preparati secondo il protocollo di Blaine Stine et al., 2003.

N-acetil-L cisteina (NAC) (Sigma); Hoechst 33342 (Sigma); DNAbeads cellulosa (Sigma). Anticorpi utilizzati in questo lavoro: mouse anti-DNA-PKcs Ab4 (Labvision Biomarker), goat anti-KU80 (Santa Cruz), goat anti-KU70 (Santa Cruz), mouse anti-Actina (Sigma), mouse anti-tubulina (Santa Cruz), laminina A/C(BD biosciences), mouse anti-SNAP25(BD biosciences), rabbit anti-NMDAR1 (Chemicon), rabbit anti-NMDAR2A/B (Chemicon), rabbit anti-NMDAR2A (Upstate), rabbit anti-NMDAR2B (Upstate), rabbit anti-GluR1-clone C3T (Upstate), rabbit anti-GluR2/3 (Upstate), rabbit anti-PSD95 (Cell signaling), donkey anti-rabbit(HRP) (Jackson immunoresearch), donkey anti-mouse(HRP) (Jackson immunoresearch), donkey anti-goat(HRP) (Jackson immunoresearch).

3.2 Colture cellulari

In questo lavoro è stata utilizzata la linea cellulare di feocromocitoma di ratto (PC12), come sistema modello per lo studio degli effetti del trattamento del peptide β -amiloide sul complesso della DNA-PK. Le cellule PC12 utilizzate in questo studio sono state coltivate in RPMI 1640 medium, con un supplemento del 10% di siero di cavallo scomplementato (HS)(Gibco), del 5% di siero fetale bovino (FBS)(Gibco), 2mM Glutammina(Gibco) e con gli antibiotici Penicillina (100 U/ml)(Gibco) e Streptomycin (100 μ g/ml)(Gibco). Le cellule sono state fatte crescere in un incubatore umidificato a 37°C in presenza di CO₂ al 5%. In relazione alle loro condizioni di crescita ed alle esigenze sperimentali, sono state periodicamente diluite e seminate alla densità desiderata.

3.3 Frazionamento cellulare delle PC12

Il frazionamento cellulare è stato eseguito secondo il protocollo di Lucero et al., 2003 modificato. Brevemente, una volta raccolte le cellule PC12 preparate come descritto nella sezione - Colture cellulari -, sono state immediatamente omogeneizzate nel tampone TEVP (10mM Tris-Cl pH 7.5, 320 mM saccarosio, cocktail di inibitori proteasi) e lasciati in ghiaccio per 30min. Successivamente sono stati centrifugati a 1000rcf per 10min a 4°C. In questo modo sono stati separati i nuclei (nuc) contenuti nel pellet dalle altre componenti cellulari, contenute nel supernatante. In seguito il

supernatante è stato centrifugato a 10000rcf per 20 min a 4°C, ottenendo la frazione mitocondriale(mit) contenuta nel pellet. Il supernatante è stato centrifugato a 128000rcf per 1h a 4°C, ottenendo i microsomi (micr) contenuti nel pellet ed il citoplasma (cyt) contenuto nel supernatante. La frazione contenete i microsomi è stata risospesa in tampone TES (10mM Tris -Cl pH 7.5, 320mM saccarasio, 5 mM EDTA, cocktail di inibitori proteasi) e ad un volume di quest'ultima sono stati aggiunti 9 volumi di carbonato di sodio 0.2M pH 7.5. Dopo 1h in ghiaccio, la risospensione è stata centrifugata a 128000rcf per 1h a 4 °C, ottenendo nel pellet la frazione contenente le proteine integrali di membrana (P) e nel supernatante la frazione contenente le proteine periferiche di membrana (S). Tutti i pellet sono stati solubilizzati in tampone RIPA (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Sodio Deossicolato, 0,1 %, cocktail di inibitori delle proteasi) e lasciati sulla ruota per 10min a 4°C, quindi centrifugati a 15000 g per 15min a 4°C. Dei supernatanti così ottenuti è stata misurata la concentrazione con il metodo della microBCA (Pierce) e infine corsi su gel di poliacrilammide. La frazione contenente le proteine periferiche (S) è stata concentrata con tubi centricon (cut-off= 3KDa).

3.4 Frazionamento cellulare delle aree cerebrali

Il frazionamento cellulare è stato eseguito secondo il protocollo di Dunah e Standaert (2001) con piccole modificazioni. Topi CD1 maschi adulti (6-9 settimane) sono stati anestetizzati con alotano in accordo con le linee guida dettate dal Ministero della Salute. Dopo asportazione del cervello si è proceduto al rapido prelievo dell'ippocampo, della corteccia, del cervelletto e dello striato. Una volta prelevate le aree sono state immediatamente omogeneizzate nel tampone TEVP [10mM Tris-Cl pH 7.5 320 mM saccarosio, cocktail di inibitori proteasi (Sigma)] e lasciati in ghiaccio per 30min. Successivamente sono stati centrifugati a 1000rcf per 10min a 4°C. In questo modo sono stati separati i nuclei (P1) dalle altre componenti cellulari (S1). La frazione S1 è stata centrifugata a 10000rcf per 20min a 4°C per ottenere la frazione contenente le membrane sinaptiche e i mitocondri (P2) e la frazione contenente le altre membrane cellulari e il citosol(S2). La frazione S2 è stata centrifugato a 129000rcf per 1h e 30min a 4°C ottenendo la frazione contenente membrane leggere, Reticolo di Golgi, membrana plasmatica (P3) e il citosol (S3). La frazione P2 è stata lisata in una soluzione ipo-osmotica (10mM Tris-Cl pH 7.5, cocktail di inibitori delle proteasi) e incubata in rotazione su una ruota per 30min a 4°C. In seguito la frazione P2 è stata centrifugata a 25000rcf g per 30min a 4 °C. In questo modo è stata ottenuta la frazione contenente le membrane sinaptiche (LP1) e la frazione contenente vescicole sinaptiche (LS1). La frazione LP1 è stata centrifugati a 25000rcf per 20min a 4°C e infine a 129000rcf per 14h a 4 °C ottenendo la frazione arricchita in

vescicole sinaptiche (LP2) e la frazione non vescicolare (LS2). Tutti i pellet sono stati infine risospesi con tampone RIPA (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Sodio Deossicolato, 0,1 %, cocktail di inibitori delle proteasi) e lasciati sulla ruota per 10min a 4°C, quindi centrifugati a 15000 g per 15min a 4°C. Dei supernatanti così ottenuti è stata misurata la concentrazione con il metodo della microBCA (Pierce) e infine corsi su gel di poliacrilammide.

3.5 SDS-PAGE e Western-Blot

Gli estratti proteici e gli immunoprecipitati sono stati separati mediante SDS-PAGE (Bio-Rad), e successivamente trasferiti su filtri di nitrocellulosa (Amersham), mediante western-blot (Bio-Rad). La percentuale di poliacrilammide utilizzata è stata scelta in base ai pesi molecolari delle proteine da analizzare. La quantità di proteine caricate è stata scelta in base alle diverse esigenze sperimentali. L'elettroforesi è stata condotta ad una corrente costante di 30 mA per circa 2 h . Successivamente le proteine sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa O/N a 30 V cost a 4°C. Le membrane sono state immerse in una soluzione di bloccaggio (10% latte, 0.1 % Tween 20, TBS) per circa 1h a temperatura ambiente o per 12h a 4°C e successivamente incubate in un'opportuna soluzione contenente un anticorpo primario specifico. Dopodiché le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di rafano (Horsedish Peroxidase, HRP) per 1h a temperatura ambiente. Le condizioni di incubazione degli anticorpi primari sono state scelte in base alle indicazioni fornite dal produttore. Infine le bande proteiche sono state rilevate mediante chemiluminescenza (Pierce), utilizzando uno scanner ad alta definizione (Typhoon 9200, Amersham) o lastre di sviluppo autoradiografico (Kodak). L'analisi densitometrica delle bande è stata condotta utilizzando il software ImageQuant (Amersham). La verifica di isocaricamento dei vari campioni è stata fatta utilizzando l'anticorpo anti-actina (Sigma) e anti-tubulina(sigma).

3.6 Valutazione della vitalità cellulare

Misura dei livelli di lattato deidrogenasi (LDH) nel medium di coltura.

Il saggio della lattato-deidrogenasi (LDH) è un test colorimetrico utilizzato per la misura della citotossicità. Esso è basato sulla misura quantitativa dell'enzima LDH rilasciato in seguito alla lisi della membrana plasmatica conseguente alla morte cellulare. La reazione di ossidazione di questo enzima produce NADH che viene fatto reagire in vitro con un sale di tetrazolio per formare un prodotto colorato, un sale di formazano rosso, misurabile allo spettrofotometro. Il saggio è stato

effettuato seguendo le istruzioni fornite dal Kit (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, PROMEGA), utilizzando colture di cellule PC12 preparate come descritto nella sezione - colture cellulari-. Brevemente, dopo 24h dal piastramento su una multiwell da 96 pozzetti, le cellule sono state trattate con varie concentrazioni di A β 25-35 e A β 35-25 per diversi tempi di incubazione a seconda delle necessità sperimentali. In ogni esperimento è stato misurato il livello di rilascio spontaneo di LDH e di rilascio massimo indotto da lisi cellulare. Al termine del trattamento, nei punti di rilascio massimo sono stati aggiunti 10 μ l di soluzione di lisi (Titon X-100) per ogni 100 μ l di medium presente in ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate per 1 ora a 37°C ad una percentuale di CO₂ del 5%. Al termine dell'incubazione la piastra è stata centrifugata a 250 g per 4 minuti a 4°C per rimuovere il debris cellulare dal supernatante, sono stati prelevati 50 μ l di campione da ogni pozzetto e trasferiti in una multiwell da 96; a questo punto, sono stati aggiunti 50 μ l della soluzione mix di substrati in ogni punto sperimentale ed incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 50 μ l per punto di una soluzione specifica per bloccare la reazione colorimetrica e infine l'assorbanza di ogni campione è stata letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 490 nm. La percentuale di cellule morte è stata calcolata utilizzando la seguente formula: % di citotossicità = LDH rilasciato – LDH spontaneo/ LDH massimo rilasciato.

Valutazione della citotossicità attraverso il saggio MTT.

Il saggio MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) è un test colorimetrico utilizzato per la misura della vitalità e proliferazione cellulare. Questa metodica si basa sulla capacità della deidrogenasi mitocondriale di scindere la molecola tetrazolica dell' MTT, in un prodotto insolubile di colore blu scuro, un sale formazano blu scuro, il quale, non essendo in grado di attraversare la membrana plasmatica, si accumula all'interno delle cellule vitali. La quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive, e capaci di replicarsi. Il saggio è stato effettuato seguendo le istruzioni fornite dal Kit (Colorimetric - MTT- assay, CHEMICON), utilizzando colture di cellule PC12 preparate come descritto nella sezione - colture cellulari-. Brevemente, dopo 24h dal piastramento su una multiwell da 96 pozzetti, le cellule sono state trattate con varie concentrazioni di A β 25-35 e A β 35-25 per diversi tempi di incubazione a seconda delle necessità sperimentali. Al termine del trattamento, sono stati aggiunti ad ogni punto sperimentale 10 μ l della soluzione costituita da 50 μ g/ml di MTT e le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C ad una percentuale di CO₂ del 5%. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lisate in isopropanolo/HCl e il lisato risospeso in modo da sciogliere i cristalli di formazano. Infine, i campioni sono stati letti allo spettrofotometro, ad una lunghezza d'onda di 570

nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 630 nm. I risultati sono stati espressi come percentuale di riduzione di MTT rispetto ai controlli.

3.7 Valutazione dell'apoptosi

Tunel assay

Il saggio TUNEL consente di visualizzare la frammentazione del DNA nucleare che si verifica durante il processo apoptotico. Questo è reso possibile dalla l'enzima ricombinate Terminal Deossinucleotidil Transferasi (rTdT), che aggiunge deossiribonucleotidi marcati (fluorescein-12-dUTP) alle estrmità 3'-OH libere generate dall'azione delle nucleasi attivate durante la morte cellulare programmata.

Il saggio è stato effettuato utilizzando colture di cellule PC12 preparate come descritto nella sezione - colture cellulari- e trattate con A β 25-35 e A β 35-25 a diverse concentrazioni e per di versi tempi a seconda delle esigenze sperimentali., seguendo le istruzioni fornite dal Kit (DeadEnd™ Fluorometric-TUNEL System, Promega). Brevemente, dopo 24h dal piastramento, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% (w/v in PBS 1X) per 5 min a temperatura ambiente. In seguito sono state permeabilizzate con una soluzione 0,2% Triton X-100 in PBS per 5 minuti. Ciascun vetrino è stato poi incubato con 50 μ l di TUNEL-reaction mixture per 1 ora a 37 °C in una camera umidificata e protetta dalla luce diretta. Avvenuta la reazione i vetrini sono stati lavati di nuovo immergendoli in PBS per 5 minuti a temperatura ambiente e analizzati al microscopio a fluorescenza usando un filtro per emissioni alla lunghezza d'onda di 560nm \pm 20nm.

Colorazione con HOECHST 33342

Le colture sono state fissate con paraformaldeide 4% (w/v in PBS 1X) per 5 min a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono state poi lavate per 2 volte in PBS 1X pH 7.5, e permeabilizzate con Triton X-100 0.2% per 5 min. I nuclei sono stati infine marcati con l'agente intercalante HOECHST 33342 (Sigma), 1mg/ml in PBS 1X per 5min. Infine le cellule sono state contate al microscopio a fluorescenza con filtro per emissioni alla lunghezza d'onda di 460nm.

3.8 .Valutazione del danno ossidativo mediante saggio di carbonilazione

Questo saggio consente di misurare il grado di carbonilazione delle proteine, causato dai dei radicali ossidrilici o di altre specie reattive, prodotte nello stress ossidativo. Per questo saggio è stato utilizzato il kit Oxyblot Protein Oxidation (Chemicon), in grado di visualizzare tramite

western blot, i gruppi carbonilici introdotti in maniera sito specifica nella catena polipeptidica in corrispondenza di residui di Lisina, Arginina, Prolina e Treonina. Per questo saggio sono state seguite le istruzioni fornite dal produttore. Brevemente, i lisati cellulari sono stati ottenuti mediante estrazione con tampone RIPA (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Sodio Deossicolato, 0,1 %, cocktail di inibitori delle proteasi) e 15µg di lisato sono stati denaturati con una soluzione 6% SDS. Nella successiva reazione di derivatizzazione, che consiste nell'aggiungere ad ogni campione un isovolume di 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH), tutti i gruppi carbonilici vengono derivatizzati a 2,4-dinitrofenilidrazone (DNP-idrazone). Dopo un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente, ad ogni campione sono stati aggiunti 7.5 µl di soluzione di neutralizzazione, per bloccare la reazione di derivatizzazione. A questo punto i campioni sono stati corsi su un gel di poliacrilammide al 12% ed analizzati tramite Western Blot, usando un'anticorpo primario anti -DNP, che va a riconoscere in maniera specifica le proteine derivatizzate con il DNP-idrazone. L'analisi densitometrica è stata eseguita come descritto nella sezione SDS-PAGE e western-blot.

3.9 Saggi di attività chinastica della DNA-PKcs

Per quantificare l'attività chinastica della subunità catalitica DNA-PKcs è stato utilizzato un saggio di attività chinastica usando il kit SignaTECT DNA-dependent protein kinase assay system (Promega).

- Per saggiare l'attività chinastica della DNA-PKcs nelle cellule PC12, queste ultime sono state trattate con Aβ(25-35), Aβ(35-25), a diverse concentrazioni e per diversi tempi. Al termine delle incubazioni le cellule sono state lisate in tampone WCE (Whole cell extract): [50 mM NaF, 20 mM Hepes (pH 7.8), 450 mM NaCl, 25% (vol/vol) glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, cocktail inibitore delle proteasi (Sigma)]. In particolare, dopo esser stati risospesi in questo tampone, i campioni sono stati sottoposti a tre cicli di congelamento/scongelo (Freeze-Thaw), al termine dei quali l'estratto proteico è stato centrifugato a 15000 rcf per 10 minuti a 4°C in modo da poter isolare il soprannatante, contenente la frazione proteica totale. A questo punto, dopo la determinazione della concentrazione proteica mediante saggio della Micro-BCA, circa 300 µg di proteine sono state sottoposte ad una tecnica di *Pull Down*, che permette la separazione delle proteine in grado di legare il DNA (compresa la DNA-PKcs) dal resto del lisato. In questa metodica è stata utilizzata la DNA-cellulosa (Sigma), un preparato contenente DNA (3 mg di DNA per ogni grammo di DNA-cellulosa) covalentemente legato alla cellulosa attraverso gruppi idrossilici liberi. Un volume di 40 µl di DNA-cellulosa è stato aggiunto ad ogni campione ed incubati in lenta

rotazione per 30' a 4°C. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati lavati con il tampone WCE. Al termine dei lavaggi, i 20 µl di DNA-cellulosa sono stati usati per il saggio di attività chinasica.

- Per saggiare l'attività chinasica della DNA-PKcs in seguito a incubazione diretta "cell-free" con Aβ, è stata utilizzata una proteina DNA-PKcs purificata (fornita dal Kit SignaTect - Promega). Brevemente 20 unità di DNA-PKcs purificata sono state incubate per 10min a 30°C, con diverse concentrazioni di Aβ(25-35), Aβ(1-42), Aβ(35-25), Aβ(42-1). Al termine dell'incubazione questi campioni sono stati utilizzati per il saggio di attività chinasica.

- per saggiare l'attività chinasica della DNA-PKcs nei sinaptosomi, la proteina è stata immunoprecipitata dalla frazione LP1 ottenuta da ippocampi di topi CD1, mediante anticorpo anti-DNA-PKcs (Ab4) o pull-down con DNA-cellulosa. Come controllo positivo è stata utilizzata la DNA-PKcs immunoprecipitata con lo stesso anticorpo, da estratti nucleari di cellule HeLa.

L'attività della DNA-PKcs è stata determinata dal grado di fosforilazione di un frammento peptidico biotinilato derivante dalla proteina p53, contenente una sequenza a.a. specificatamente riconosciuta dalla DNA-PKcs, seguendo le istruzioni fornite dal Kit. Brevemente, tutti i campioni sono stati incubati a 30°C per 30 minuti in presenza di 15 µl di una soluzione di reazione chinasica (fornita dal kit), contenente $\gamma^{32}\text{-P}$ (1µCi per punto sperimentale) con e senza il peptide. Al termine del trattamento sono stati aggiunti ad ogni campione 10 µl di soluzione di terminazione, in modo da bloccare la reazione chinasica. A questo punto, 10 µl di questa soluzione sono stati 'spottati' su una membrana di cellulosa contenente Streptavidina. Dopo una serie di lavaggi sia la membrana spottata che 5µl di campione non spottato usato come normalizzatore, sono stati caricati nei tubi da scintillazione e la quantità di $\gamma^{32}\text{-P}$ incorporata è stata misurata al β-counter (Beckman coulter) ed espressa in conte per minuto (cpm) incorporate per campione.

3.10 Saggio di autofosforilazione della DNA-PKcs

Per confermare che la DNA-PKcs possiede attività chinasica nelle membrane sinaptiche (dato già osservato mediante il saggio di attività chinasica descritto nella sezione precedente), è stato eseguito un saggio chinasico di autofosforilazione sulla proteina immunoprecipitata dalla frazione LP1 preparati a partire da ippocampi di topi CD1. Brevemente, la proteina è stata isolata dalla frazione LP1 mediante immunoprecipitazione con anticorpo anti-DNA-PKcs (Ab4) o pull-down con DNA-cellulosa. Successivamente la resina o la DNA-cellulosa è stata incubata a 30°C per 30 minuti in presenza di 15 µl di una soluzione di reazione chinasica (fornita dal kit SignaTECT - Promega), contenente $\gamma^{32}\text{-P}$ (3µCi per punto sperimentale). Al termine del trattamento sono stati aggiunti ad ogni campione 10 µl di soluzione di terminazione, in modo da bloccare la reazione

chinasica. La miscela di reazione è stata successivamente separata in SDS-PAGE. Al termine della corsa il gel è stato fissato con una soluzione di fissaggio (20% metanolo, 10% acido acetico) per 1 ora a temperatura ambiente. Infine il gel è stato seccato con un gel-dryer (Amersham) e la presenza di proteine fosforilate visualizzata mediante autoradiografia del gel su opportune lastre fotografiche. L'acquisizione delle immagini è stata effettuata con il software ImageQuant (Amersham).

3.11 Immunoprecipitazione

Per separare selettivamente le molecole d'interesse dal resto dell'estratto è stata impiegata la tecnica dell'immunoprecipitazione. A tal fine è stata usata una resina di Sefarosio legata covalentemente alla Proteina G. La resina da utilizzare è stata inizialmente sottoposta a tre lavaggi in tampone TBS (Tris-buffered saline) (50mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl), centrifugando ogni volta a 500rcf per 1min. Questi lavaggi preliminari sono necessari alla rimozione della sodio-azide (NaN_3) nella quale è conservata la resina. A questo punto si è aggiunta la resina ad una certa quantità (circa 500 μg) di campione da immunoprecipitare (lisati proteici provenienti dalla frazione LP1) e la si è lasciata in incubazione per circa 1h a 4°C, per eliminare le proteine che eventualmente si legano in maniera aspecifica alla resina. Successivamente si è centrifugata a 1000rcf per 1min a 4°C per separare il supernatante dalla resina che verrà quindi eliminata. Per immunoprecipitare la proteina d'interesse, il campione così ottenuto è stato incubato su una ruota in rotazione a 4°C per 12-16 ore con una quantità definita di anticorpo specifico. Al termine dell'incubazione è stata aggiunta la resina precedentemente lavata (circa 20 μl) per circa 2-4 ore, per permettere il legame con l'anticorpo. Quindi il campione è stato centrifugato a 500 rcf per 1min a 4°C, il supernatante è stato rimosso e la resina è stata lavata 6 volte con un tampone di lavaggio (50 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, cocktail di inibitori delle proteasi). A questo punto gli immunoprecipitati sono pronti per esser caricati sul gel di poliacrilammide, previa risospensione della resina nella soluzione riducente e denaturante di caricamento. Come controllo della specificità di legame degli anticorpi, gli estratti proteici sono state immunoprecipitati con un IgG non rilevante.

3.12 Registrazioni elettrofisiologiche

La trasmissione sinaptica di base (basal synaptic transmission, BST), la facilitazione sinaptica (paired pulse facilitation, PPF) e il potenziamento a lungo termine (long term potentiation, LTP) sono stati esaminati nella regione CA1 in fettine di ippocampo di topo. Topi BALBC e SCID maschi adulti (6-9 settimane) sono stati anestetizzati con alotano in accordo con le linee guida dettate dal Ministero della Salute. Dopo asportazione del cervello si è proceduto al rapido prelievo

dell'ippocampo e alla sua sezione in fettine trasversali dello spessore di 450 μm tramite un McIlwain Tissue Chopper (Mickle Laboratory Engeneering Co., Gomshall, UK). Le fettine sono state incubate a $33 \pm 1^\circ\text{C}$, mantenute in una camera ad interfaccia e perfuse a flusso costante di 1,2 ml/min con una soluzione RINGER simile al liquido cefalo-rachidiano, contenente: NaCl 124 mM, KCl 2 mM, KH_2PO_4 1.25 mM, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 2 mM, NaHCO_3 26 mM, glucosio 10 mM, equilibrata con 95% O_2 / 5% CO_2 (pH 7,4). La stimolazione ortodromica extracellulare (200-500 μA , 50 ms, 0,1 μHz) è stata applicata mediante un elettrodo di platino posizionato nelle collaterali di Schaffer. La registrazione extracellulare del potenziale post sinaptico eccitatorio (EPSP) è stata effettuata nello strato radiato della regione CA1 mediante un microelettrodo di vetro riempito con NaCl 2M e avente resistenza pari a 5-10 $\text{M}\Omega$. Le risposte sono state trasformate in segnale digitale, acquisite ogni 10 secondi, memorizzate ogni minuto come media di sei registrazioni e misurate tramite un computer attraverso un software dedicato (Axon, Foster City, CA, USA).

Per quanto riguarda il potenziamento a lungo termine (LTP), esso è stato indotto tramite una stimolazione tetanica a 100 Hz per 1s. I valori prima e dopo il tetano sono stati misurati analizzando l'ampiezza degli EPSP ed espressi come $\text{EPSP}/\text{EPSP}_{\text{basale}} * 100$ (dove per $\text{EPSP}_{\text{basale}}$ si intende in questo caso l'ampiezza del EPSP prima della tetanizzazione). I valori riportati nelle figure rappresentano le medie (\pm errore standard della media) di registrazioni ottenute da differenti fettine. Per gli esperimenti sulla facilitazione sinaptica (PPF), le risposte sono state registrate dopo l'applicazione di interstimoli a vari intervalli di tempo (20-200 ms) e ottenute da fettine in condizioni di controllo. L'interstimolazione è fornita ogni 20 secondi così che i potenziali post sinaptici eccitatori registrati in un dato minuto sono la media di tre interstimolazioni successive. I valori nelle figure sono le medie (\pm errore standard della media) di registrazioni ottenute da differenti fettine.

3.13 Analisi statistica

I dati sono stati espressi come valori medi \pm deviazione standard. Per la valutazione statistica delle differenze osservate tra i vari punti sperimentali sono stati utilizzati il test t di Student e il test one-way ANOVA, adottando una soglia minima di significatività pari a $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Caratterizzazione della localizzazione subcellulare del complesso DNA-PK in cellule PC12

Le proprietà patofisiologiche del peptide A β possono essere studiate sia *in vitro* che *in vivo* attraverso l'uso di peptidi sintetici. In particolare, il peptide A β 25-35 è molto usato poiché mantiene le proprietà chimico-fisiche e fisiopatologiche del peptide intero e contemporaneamente è più corto e più facile da sintetizzare e modificare per crearne delle forme derivate (Yankner et al., 1989). Questo peptide è costituito da 11 aminoacidi e rappresenta la regione biologicamente attiva dei peptidi A β 1-40 e 1-42. Esso tende ad aggregare con il tempo, formando strutture fibrillari ad alto contenuto di beta sheet ed il suo grado di tossicità è legato allo stato di aggregazione (Pike et al., 1993; Pike et al., 1995; Kaminsky et al., 2009).

Un buon modello di cellule di mammifero per studiare gli effetti patofisiologici del peptide A β è rappresentato dalle cellule PC12. Questa linea cellulare di feocromocitoma di ratto, sia nello stato differenziato che proliferante, risulta particolarmente sensibile all'azione citotossica dell'A β rispetto ad altre linee neuronali sia umane che murine (Shearman et al., 1994) e manifesta l'attivazione di "signaling" cellulari simili a quelli riscontrati in modelli *in vivo* di AD.

Per tali ragioni, al fine di analizzare gli effetti funzionali del peptide A β sul complesso della DNA-PK, abbiamo utilizzato come modello cellulare le PC12 e come modello di A β principalmente il peptide A β 25-35.

Come primo passo in questa direzione abbiamo preliminarmente caratterizzato la distribuzione del complesso DNA-PK nei diversi compartimenti intracellulari di cellule PC12. A tal fine abbiamo eseguito un frazionamento biochimico mediante tecniche di centrifugazione ed ultracentrifugazione (Sezione "Materiali e Metodi"), seguito da Western Blot diretto verso la subunità catalitica della DNA-PK (DNA-PKcs) e le proteine Ku70 e Ku86. Come si può osservare nella Figura 1, la DNA-PKcs è localizzata non solo nella frazione nucleare (nuc) ma anche in quella microsomiale (micr). Al fine di verificare la forza dell'associazione molecolare tra membrane cellulari e DNA-PKcs, abbiamo trattato la frazione microsomiale con 0.1 M di sodio carbonato pH 11.5 (Carb Extr), una condizione in grado di estrarre in modo preferenziale le proteine periferiche di membrana. Come si può vedere, soltanto una frazione della DNA-PKcs si estrae con questo metodo (indicata con S) e quindi si comporta come una proteina periferica di membrana, mentre la maggior parte rimane ancorata strettamente alle membrane (indicata con P). Considerando che la DNA-PKcs non contiene sequenze amminoacidiche o caratteristiche biochimiche note che gli permettano di inserirsi nelle membrane cellulari, è plausibile ipotizzare come la sua forte interazione con le membrane possa essere indiretta, mediata ad esempio da proteine integrali di membrana (come i recettori

transmembrana). Pur essendo principalmente distribuite tra nucleo (nuc) e citoplasma (cyt), anche Ku70 e Ku86 possono essere individuate nella frazione microsomiale. A differenza della DNA-PKcs queste proteine sono facilmente estraibili mediante trattamento con sodio carbonato, suggerendo una forza di interazione con le membrane di gran lunga inferiore rispetto a quella della DNA-PKcs.

I Western Blot per le proteine tubulina, laminina A/C e SNAP 25 dimostrano l'effettiva purezza delle frazioni isolate (rispettivamente citoplasmatica, nucleare e microsomiale).

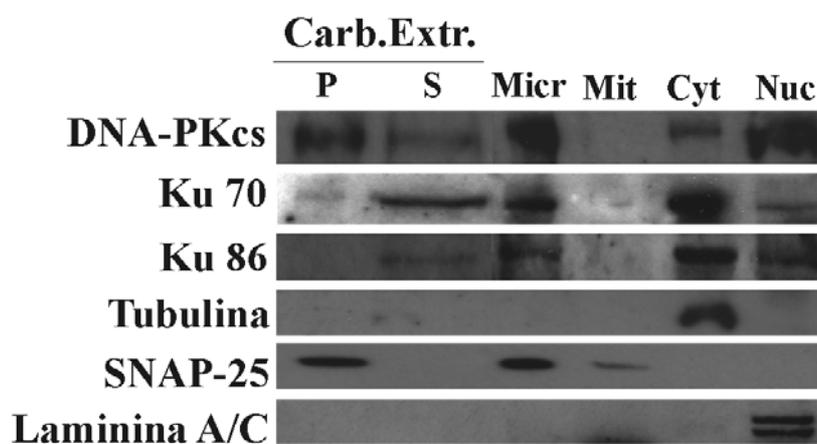


Figura 1. Localizzazione del complesso della DNA-PK nelle cellule PC12.

Analisi per Western Blot delle subunità del complesso della DNA-PK nelle varie frazioni subcellulari di cellule PC12. Come controlli della purezza del frazionamento sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: per la frazione nucleare (Nuc) l'anti-Laminina A/C; per la frazione microsomiale (Micr) l'anti-SNAP25 e per la frazione citoplasmatica (Cyt) l'anti-Tubulina. Le *lane* (P) ed (S) corrispondono alle frazioni arricchite in proteine integrali di membrana e alle proteine periferiche di membrana, rispettivamente.

4.2 Effetti del trattamento con la forma aggregata del peptide A β 25-35 sulla vitalità cellulare

Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che la subunità catalitica della DNA-PK è degradata durante il processo apoptotico (Casciola-Rosen et al., 1995; Song et al., 1996; McConnell et al., 1997). Per escludere eventuali effetti del peptide A β 25-35 sul complesso della DNA-PK associati al processo apoptotico, è stata effettuata una prima serie di esperimenti per mettere a punto le concentrazioni ed i tempi di trattamento con il peptide A β in corrispondenza dei quali tale processo non sia stato ancora innescato. Abbiamo prima di tutto eseguito una serie di saggi di

vitalità cellulare (MTT, LDH, Tunel e colorazione con Hoechst 33342) su cellule PC12 utilizzando la forma aggregata del peptide A β 25-35 in un “range” di concentrazioni di 1-50 μ M per un intervallo temporale di 4-72 ore. Le condizioni di aggregazione da noi utilizzate (vedi “Materiali e Metodi” paragrafo 3.1) non permettono di associare in modo specifico gli effetti osservati con le forme fibrillari od oligomeriche del peptide A β 25-35, anche se la solubilizzazione in acqua e l’incubazione per 7 giorni a 37°C sono note favorire la formazione di specie fibrillari.

Come si può osservare nella Figura 2A, il trattamento di 24 ore con A β 25-35 inibisce in modo dose-dipendente il metabolismo mitocondriale, misurato in termini di riduzione percentuale di MTT, con un’inibizione di circa il 70% in presenza di 50 μ M di A β 25-35. Questo effetto è molto precoce poiché l’inibizione raggiunge il 60% già dopo 4 ore di trattamento con 50 μ M di A β 25-35 (Figura 2B).

Il metabolismo mitocondriale è uno dei primi sistemi cellulari ad essere danneggiato in presenza del peptide A β (Shearman et al., 1994). Poiché questo processo è sostanzialmente reversibile, come misura della vitalità cellulare abbiamo usato il saggio dell’LDH, che misura il rilascio della lattico deidrogenasi nel mezzo di coltura a seguito della lisi cellulare. I pannelli C e D della Figura 2 mostrano come anche a dosi elevate (50 μ M di A β 25-35) il rilascio di LDH nel mezzo di coltura raggiunge appena il 10% rispetto alle cellule non trattate, per di più soltanto dopo 24 ore di trattamento.

Poiché è stato ampiamente dimostrato che il peptide A β 25-35 è in grado di indurre apoptosi in determinate condizioni sperimentali (Kaminsky et al., 2009), abbiamo utilizzato come saggi specifici il TUNEL e la conta delle cellule aventi nuclei condensati e/o frammentati mediante colorazione con Hoechst 33342. Come mostrato in Figura 2E e 2F, la percentuale di cellule apoptotiche rilevata in entrambi i saggi è molto bassa in seguito al trattamento con A β 25-35 in tutte le condizioni sperimentali usate.

L’insieme di tutti questi dati suggerisce come almeno entro le 24 ore di trattamento, alla concentrazione di 50 μ M di A β 25-35, si ha una forte inibizione del metabolismo mitocondriale che non è però associata ad un processo di morte cellulare né per apoptosi né per necrosi. Di conseguenza, queste condizioni sperimentali possono essere definite subletali e sono state utilizzate per tutti gli esperimenti successivi per analizzare gli effetti specifici di A β sul complesso della DNA-PK non correlati a fenomeni di morte cellulare. E’ importante notare come nessuno degli effetti sopradescritti siano indotti dal trattamento con il peptide inverso 35-25 a dimostrazione della specificità dei risultati ottenuti (dati non mostrati).

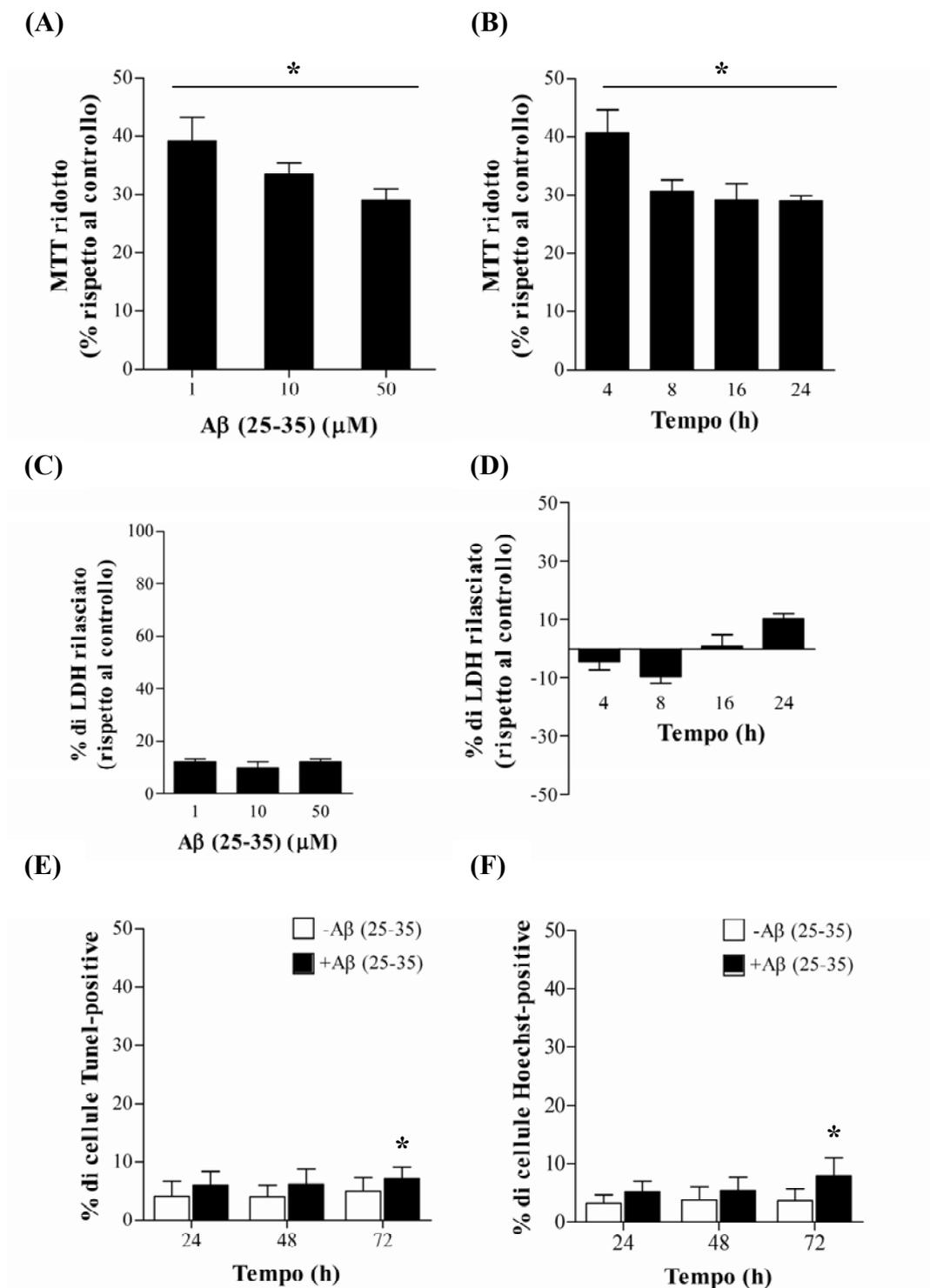


Figura 2. Misura della vitalità cellulare e dell'apoptosi nelle cellule PC12 trattate con il peptide β-amiloide.

(A) Effetto dose-risposta a 24h del peptide Aβ(25-35) sul metabolismo mitocondriale, espresso come % di MTT ridotto. (B) Effetto tempo-risposta del peptide Aβ(25-35)(50μM) sul metabolismo mitocondriale, espresso come % di MTT ridotto. (C) Effetto dose-risposta a 24h del peptide Aβ(25-35) sulla integrità della membrana plasmatica, espresso come quantità % di LDH rilasciato nel mezzo di coltura. (D) Effetto tempo-risposta del peptide Aβ(25-35)(50μM) sull'integrità della membrana plasmatica, espresso come quantità % di LDH rilasciato nel mezzo di coltura. (E) Effetto tempo dipendente del peptide Aβ(25-35) sull'apoptosi, espressa come % di cellule positive al TUNEL. (F) Effetto tempo dipendente del peptide Aβ(25-35) sull'apoptosi, espressa come % di cellule positive all'Hoechst 33342. Tutti i risultati mostrati sono espressi come percentuale rispetto ai controlli corrispondenti. Le barre di errore rappresentano la media ± deviazione standard (n= 10 *P<0.05).

4.3 Concentrazioni subletali del peptide A β 25-35 inibiscono l'attività chinastica della DNA-PK

La DNA-PK fa parte della famiglia delle PIKK e possiede un'attività serin-treonin chinastica essenziale per mediare la sua funzione nel sistema di riparazione dei DSBs mediante NHEJ. E' stato precedentemente riportato che la forma umana solubile del peptide A β inibisce l'attivazione specifica di alcune chinasi tra le quali la PI3K activated protein AKT/PKB, in colture ippocampali murine (Townsend et al., 2007). Ipotizzando una possibile inibizione dell'attività chinastica della DNA-PK mediata da A β , abbiamo analizzato l'attività chinastica della proteina isolata da lisati di cellule PC12 trattate con diverse concentrazioni subletali del peptide A β 25-35. In particolare il saggio di attività chinastica è stato effettuato valutando la capacità della DNA-PK, precipitata mediante DNA-cellulosa, di fosforilare *in vitro* il suo specifico substrato p53. Come si può osservare nella Figura 3A, il peptide A β 25-35 è in grado di inibire l'attività chinastica della DNA-PK in modalità dose-risposta, con un effetto massimo a 50 μ M dopo 24 ore. Tale effetto è già rilevabile dopo 4-8 ore di trattamento (50 μ M) con un' inibizione di circa il 70-75%, che culmina con la totale assenza di attività dopo 24 ore (Fig. 3B).

Un'inibizione dell'attività chinastica della DNA-PK potrebbe essere causata sia da una riduzione dei livelli proteici della subunità catalitica DNA-PKcs che delle subunità regolatorie Ku70 e Ku86 (Gottlieb and Jackson 1993, Collis et al., 2005). Pertanto, mediante Western Blot con anticorpi specifici, abbiamo esaminato i livelli proteici delle tre proteine del complesso in seguito a trattamento delle cellule PC12 con varie dosi di A β 25-35. La Figura 4 mostra come i livelli proteici della DNA-PKcs siano ridotti in maniera dose-risposta, con l'effetto maggiore osservabile dopo 24 ore di trattamento con 50 μ M di A β 25-35 (30% rispetto al controllo, calcolato mediante analisi densitometrica delle bande corrispondenti, pannelli 4A e 4C). Al contrario, i livelli proteici di Ku70 e Ku86 rimangono sostanzialmente inalterati in tutte le condizioni sperimentali usate (Fig. 4A pannello inferiore). La colorazione con l'anticorpo anti-actina è mostrata per verificare il corretto isocaricamento proteico nelle varie *lane* del gel.

E' interessante notare come dopo 4 ore di trattamento non si ha una diminuzione dei livelli proteici di DNA-PKcs anche se i corrispondenti livelli di attività chinastica sono già fortemente colpiti (confronta Fig. 3B con istogramma in Fig.4C). Questo risultato suggerisce che la diminuzione dei livelli proteici della DNA-PKcs non è l'unica causa dell'inibizione della sua attività chinastica indotta dal trattamento delle cellule PC12 con A β 25-35.

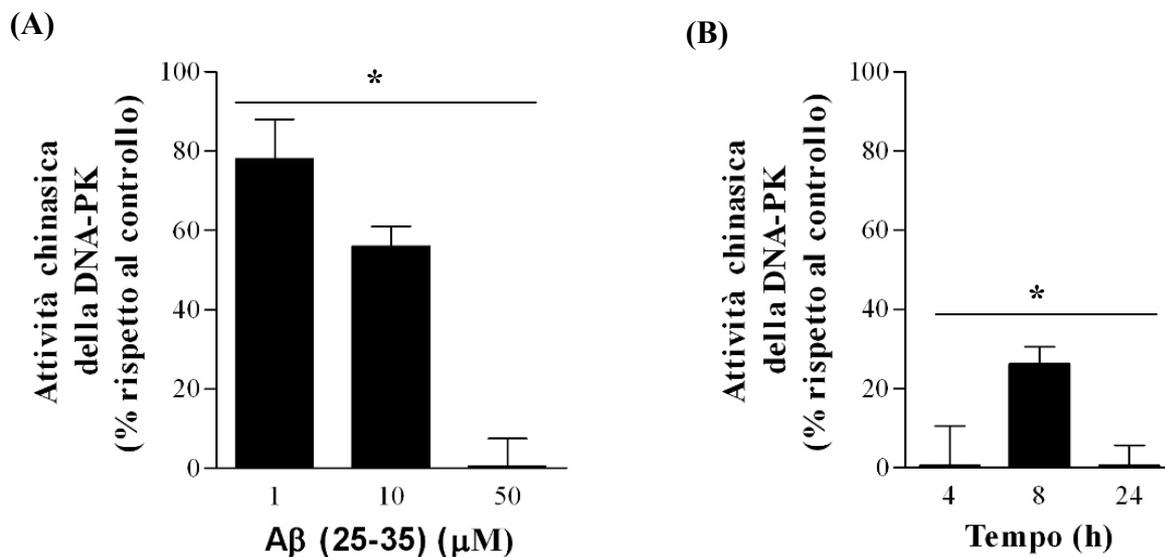


Figura 3. Misura della attività chinasi della DNA-PK nelle cellule PC12 trattate con il peptide Aβ 25-35.

Il saggio di attività chinasi è stato eseguito nei confronti di un peptide sintetico della proteina p53, riconosciuto in modo specifico dalla DNA-PK. (A) Effetto dose-risposta a 24h del peptide Aβ(25-35) sull'attività chinasi della DNA-PK, espressa come % di riduzione, rispetto al controllo. (B) Effetto tempo-risposta del peptide Aβ(25-35)(50μM) sull'attività chinasi della DNA-PK, espressa come % rispetto al controllo. Le barre di errore rappresentano la media ± deviazione standard (n= 3 *P<0.05).

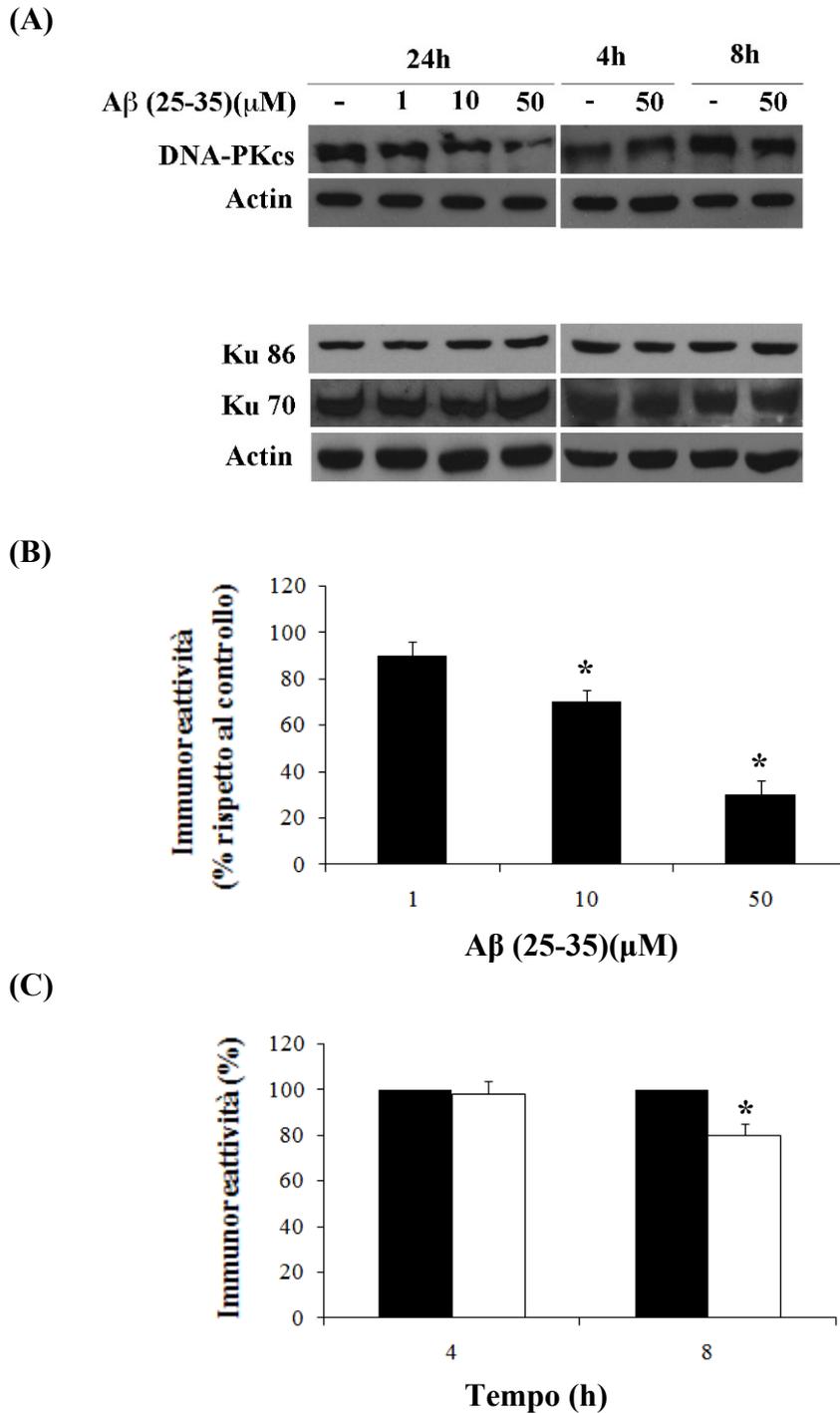


Figura 4. Effetto del peptide β -amiloide (25-35) sui livelli proteici del complesso della DNA-PK.

(A) Effetto dose-risposta e tempo-risposta sui livelli proteici della DNA-PKcs, Ku70 e Ku80, in seguito al trattamento con A β (25-35). Analisi densitometrica delle bande corrispondenti ai livelli proteici della DNA-PKcs, in seguito a trattamento per 24h con differenti dosi di A β (25-35) (B) e con 50 μ M di A β (25-35) a differenti tempi (C). I valori sono espressi come percentuale rispetto al controllo e le barre di errore rappresentano la media \pm deviazione standard (n=3 *P<0.05). Gli estratti proteici sono stati isocaricati e come controllo del caricamento è stata utilizzata l'actina.

4.4 Lo stress ossidativo contribuisce all'azione inibitoria del peptide A β 25-35 nei confronti dell'attività chinastica della DNA-PK

Studi precedenti hanno dimostrato che i livelli di attività chinastica della DNA-PK sono inversamente correlati con i livelli di ROS prodotti in seguito a trattamento con agenti antitumorali e che il trattamento con antiossidanti è in grado di ripristinare i livelli originari di attività chinastica (Boldogh et al., 2003; Lu et al., 2005). Inoltre, numerosi esperimenti eseguiti su linee cellulari e colture neuronali primarie trattate con il peptide A β hanno evidenziato come questo peptide eserciti le sue funzioni neurotossiche mediante la produzione di alti livelli di ROS (Huang et al., 1999) con conseguente danno a carico del sistema respiratorio mitocondriale ma più in generale dei sistemi macromolecolari principali, lipidi, proteine e acidi nucleici (Butterfield 2002).

Sulla base di questi dati abbiamo innanzitutto verificato che anche nelle nostre condizioni sperimentali il peptide A β 25–35 fosse in grado di indurre stress ossidativo. A tale scopo abbiamo eseguito l'analisi dei livelli di carbonilazione proteica associati al trattamento con A β 25–35, una modificazione post-traduzionale generalmente causata dalla produzione di ROS (Stadtman 1993).

Il Western Blot mostrato in Figura 5A evidenzia alti livelli di carbonilazione in seguito al trattamento di 24 ore con 50 μ M di A β 25-35. Il *time course* effettuato con questa concentrazione suggerisce che già dopo 8 ore di trattamento i livelli di carbonilazione sono sensibilmente più alti rispetto alle cellule non trattate. Il pannello della Figura 5B mostra la colorazione al Comassie Blue degli stessi campioni proteici analizzati per confermare il loro effettivo isocaricamento.

Per esaminare il contributo della componente ossidativa sull'attività chinastica dell'DNA-PK, abbiamo effettuato un saggio di attività chinastica della proteina isolata da estratti proteici derivati da cellule PC12 trattate con 50 μ M di A β 25-35 (per 24 ore), in presenza o meno di 0.5 mM di N-acetil-L cisteina (NAC), un precursore del glutathione, la cui azione antiossidante su cellule PC12 trattate con A β è stata precedentemente dimostrata (Chen et al., 2009). Al fine di scegliere la concentrazione di NAC appropriata, abbiamo effettuato un saggio di attività chinastica della DNA-PK isolata da cellule PC12 trattate per 24 ore con 0.5, 1, 5 e 10 mM di NAC. Questi esperimenti hanno indicato che la concentrazione di 0.5 mM di NAC sia quella ottimale poiché non interferisce con l'attività chinastica basale della DNA-PK pur mantenendo la sua azione antiossidante (dati non mostrati). Come illustrato in Figura 5C, il trattamento con NAC 0.5 mM (4 ore di pre-trattamento seguito da 24 ore di incubazione in presenza di A β) è in grado di attenuare l'azione inibitoria del peptide A β 25-35 sull'attività chinastica della DNA-PK (82% di attività chinastica rispetto a 21% in assenza di NAC) indicando come la produzione di ROS mediata dalla forma aggregata del peptide A β 25-35 contribuisca ad alterare l'attività chinastica della DNA-PK.

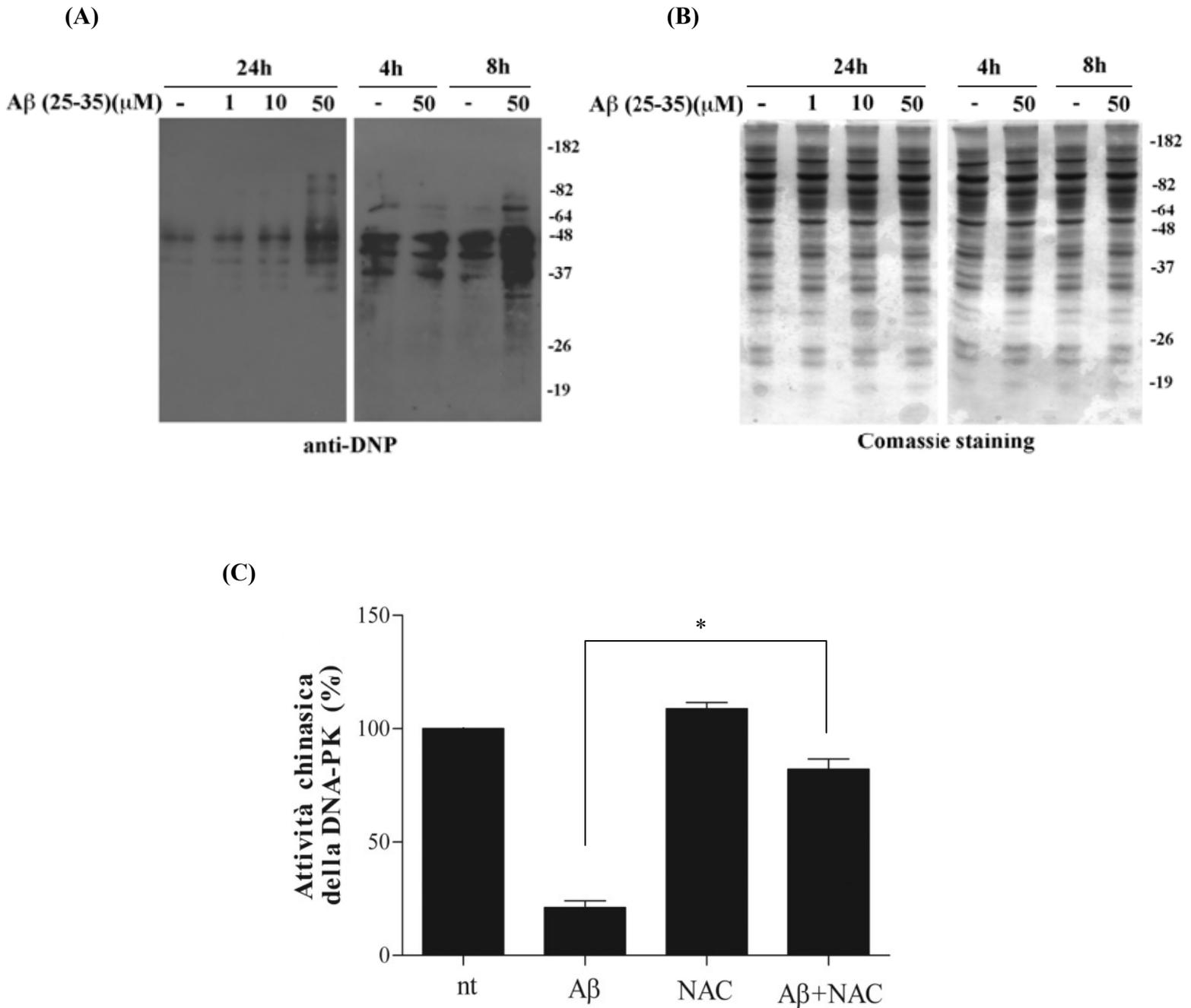


Figura 5. Lo stress ossidativo contribuisce all'azione inibitoria del peptide Aβ 25-35 nei confronti dell'attività chinasi della DNA-PK.

(A) Analisi dei livelli di carbonilazione proteica associati al trattamento con Aβ(25–35) mediante Western Blot con anticorpo anti-DNP. (B) Controllo dell' effettivo isocaricamento del Western Blot mostrato in pannello A fatto mediante colorazione con Comassie Blue. (C) Effetto dell'antiossidante N-Acetil-Cisteina (NAC) sull'inibizione dell'attività chinasi della DNA-PK dovuta al trattamento con Aβ(25-35) espressa come % di riduzione rispetto al controllo. Il saggio di attività chinasi è stato eseguito nei confronti di un peptide sintetico della proteina p53, riconosciuto in modo specifico dalla DNA-PK. I valori sono espressi come percentuale rispetto al controllo e le barre di errore rappresentano la media \pm deviazione standard (n=4 * P<0.05).

4.5 A β è in grado di inibire direttamente l'attività chinasi della DNA-PK

Lavori precedenti hanno dimostrato che il peptide A β , sia nelle sue forme solubili che aggregate, applicato extracellularmente, penetra all'interno della cellula, suggerendo una potenziale interazione con componenti proteiche intracellulari (Nagele et al., 2002; Saavedra et al., 2007). In particolare, è stato riportato come la forma umana solubile del peptide A β inibisce l'attivazione specifica di alcune chinasi quali la *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II* (CAMKII), le *Extracellular Regulated Kinases* (ERK/MAPK) e AKT/PKB in colture ippocampali murine (Townsend et al., 2007). Tuttavia, il modo attraverso cui il peptide A β è in grado di esercitare questa azione non è ancora stato identificato. Recenti dati evidenziano come il peptide A β nella sue forme fibrillari ed oligomeriche, è potenzialmente in grado di inibire direttamente diverse componenti enzimatiche del complesso proteolitico dei proteasomi (Tseng et al., 2008; Cecarini et al., 2008) almeno in un sistema "cell-free", utilizzando proteasomi isolati. Sulla base di questi dati abbiamo ipotizzato che il peptide A β potesse avere un'azione inibitoria diretta anche nei confronti dell'attività chinasi della DNA-PK. A tal fine abbiamo messo a punto un saggio di attività chinasi *in vitro* utilizzando la DNA-PK umana purificata da cellule HeLa ed incubandola con concentrazioni crescenti di A β 25-35 aggregata e di A β 1-42 oligomerica, preparata secondo il metodo di Stein et al. 2003. Come controllo positivo abbiamo utilizzato le medesime concentrazioni dei peptidi inversi A β 35-25 e A β 42-1. Prima di effettuare il saggio la DNA-PK purificata è stata pre-incubata con diverse concentrazioni di A β per 10 minuti a 30°C. Questa condizione sperimentale è risultata essere la più efficace per rilevare gli effetti inibitori dell'A β senza interferire con i livelli di attività basale della DNA-PK. Come riportato in Figura 6A, il peptide A β 25-35 nella sua forma aggregata inibisce l'attività chinasi della DNA-PK in modalità dose-risposta, con un effetto già rilevabile ad 1 μ M (89% di attività rispetto al controllo), raggiungendo l'effetto massimo alle concentrazioni di 10 e 100 μ M (33% e 30 % di attività rispetto al controllo rispettivamente). E' opportuno notare come il peptide inverso A β 35-25 non manifesti alcuna azione inibitoria nei confronti dell'attività chinasi della DNA-PK.

Un risultato analogo è stato ottenuto utilizzando preparazioni oligomeriche del peptide A β 1-42, le forme maggiormente neurotossiche del peptide A β . L'incubazione con A β 1-42 causa un'inibizione dell'attività chinasi della DNA-PK del 25% alla concentrazione di 1 μ M, che raggiunge l'83% di inibizione con 100 μ M di peptide. Anche in questo caso l'incubazione con il peptide inverso 42-1 non mostra effetti significativi (Figura 6B).

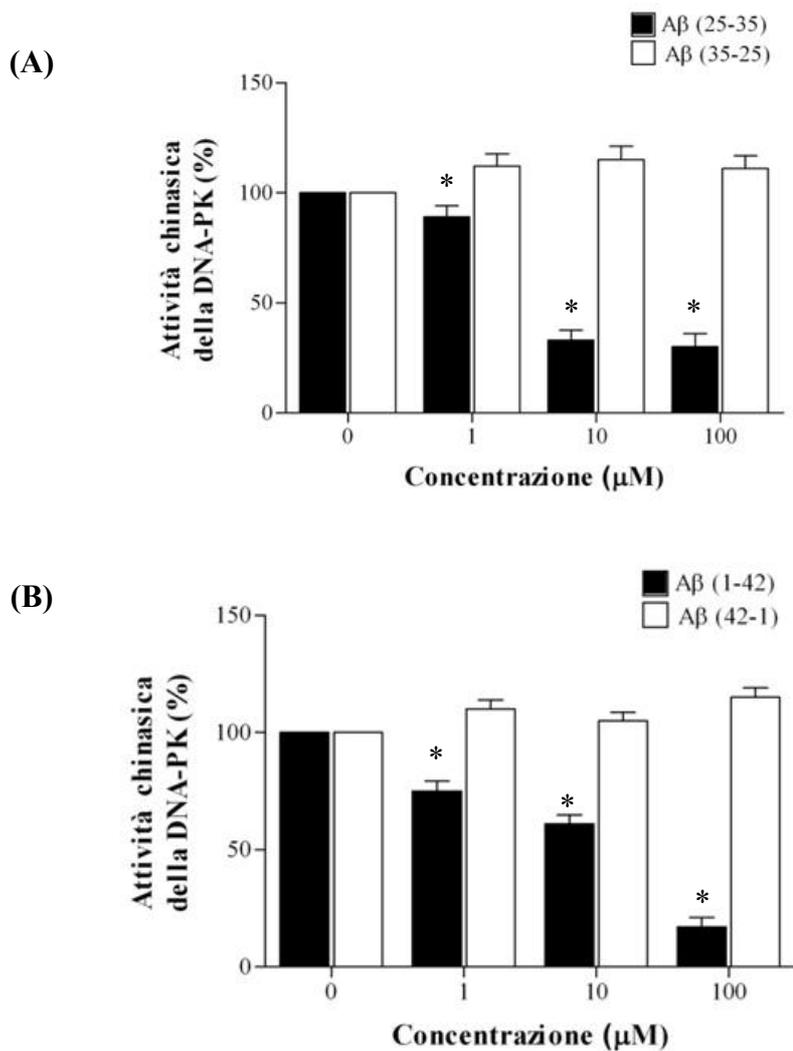


Figura 6. Effetto dell'azione diretta dei peptidi Aβ(25-35) e Aβ(1-42) sull'attività chinasi della DNA-PK.

Effetto dose-risposta del peptide Aβ(25-35) (A) e Aβ(1-42) sull'attività chinasi della DNA-PK, espressa come % rispetto al controllo. Il saggio di attività chinasi è stato eseguito nei confronti di un peptide sintetico della proteina p53, riconosciuto in modo specifico dalla DNA-PK. I valori sono espressi come percentuale e le barre di errore rappresentano la media \pm deviazione standard (n=3 *P<0.05).

4.6 Espressione del complesso della DNA-PK in diverse aree cerebrali murine

E' stata precedentemente riportata una significativa diminuzione dei livelli proteici e dell'attività di NHEJ della DNA-PK nella corteccia medio frontale prelevata postmortem da pazienti affetti da AD, rispetto a quelli evidenziati in reperti autoptici cerebrali di pazienti sani (Shackelford, 2006), suggerendo una correlazione tra neurodegenerazione e alterazione dell'attività di NHEJ. Sebbene il meccanismo molecolare responsabile della riduzione dell'attività della DNA-PK in AD non sia stato ancora identificato, i nostri risultati indicano per la prima volta una relazione causale tra il

peptide A β e la diminuzione dei livelli di espressione e di attività della DNA-PK in un modello cellulare neuronale.

A tutt'oggi, una dettagliata caratterizzazione della distribuzione del complesso della DNA-PK nelle diverse aree cerebrali non è stata riportata in letteratura così come la sua localizzazione subcellulare nel tessuto nervoso ed un suo eventuale ruolo alternativo nei neuroni rispetto alla ben nota funzione di riparazione del DNA.

A tale scopo, mediante Western Blot, abbiamo analizzato i livelli di espressione del complesso della DNA-PK in diverse aree cerebrali e principalmente quelle colpite da malattie neurodegenerative quali corteccia, ippocampo, striato e cervelletto. Eguali quantità di estratti proteici ottenuti dalle diverse aree cerebrali sono state separate in SDS-PAGE, trasferite su membrane di nitrocellulosa e colorate con anticorpi diretti contro la DNA-PKcs, Ku86 e Ku70. I risultati illustrati in Figura 7 indicano che tutte le componenti del complesso sono espresse nelle aree cerebrali analizzate. In particolare, abbiamo rilevato nel cervelletto i più alti livelli di espressione della DNA-PKcs, seguiti da livelli comparabili nella corteccia ed ippocampo e livelli inferiori nello striato. La subunità regolatoria Ku70 risulta maggiormente espressa nel cervelletto e nello striato e presente a livelli inferiori nella corteccia e nell' ippocampo. La subunità regolatoria Ku 86 (o Ku 80) mostra invece livelli comparabili in tutte le aree cerebrali. La colorazione con anticorpo anti β -tubulina è mostrata per verificare il caricamento proteico.

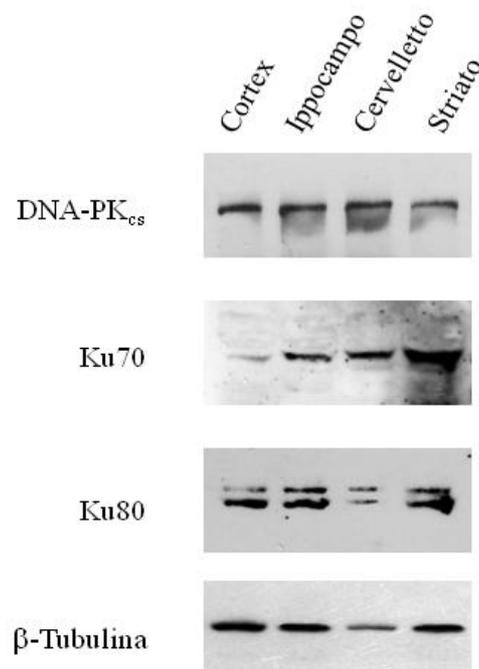


Figura 7. Espressione del complesso della DNA-PK in diverse aree cerebrali murine.

Analisi per Western Blot dei livelli proteici delle subunità del complesso della DNA-PK nelle aree cerebrali murini. Come controllo dell' isocarcamento è stato utilizzato un anticorpo anti β -tubulina.

4.7 Localizzazione e attività chinastica della DNA-PKcs nelle membrane sinaptiche

E' noto che il complesso della DNA-PK è assemblato nel nucleo dove svolge la funzione di riparare/segnalare le rotture a doppio filamento del DNA (Collis et al., 2005). Tuttavia, alcuni lavori presenti nella letteratura scientifica hanno mostrato una localizzazione del complesso della DNA-PK anche a livello della membrana plasmatica, suggerendo la possibilità che esso possa giocare anche un ruolo diverso da quello del riparo del danno al DNA. In particolare, il gruppo di ricerca di Taccioli ha per primo mostrato che in diverse linee cellulari di mammifero tutte e tre le componenti del complesso della DNA-PK sono associate ai raft lipidici (Lucero et al., 2003) microdomini specializzati coinvolti in una miriade di funzioni cellulari come la trasduzione del segnale, il traffico proteico di membrana, il differenziamento neuronale e la modulazione della trasmissione sinaptica. Al fine di analizzare la localizzazione subcellulare della DNA-PKcs nella corteccia e nell'ippocampo, le aree cerebrali più colpite in AD, mediante Western Blot abbiamo esaminato l'espressione della proteina nei vari compartimenti subcellulari di omogenati di tali aree cerebrali, preparati secondo il protocollo di frazionamento biochimico descritto nei materiali e metodi (paragrafo 3.4) e illustrato nello schema di Figura 8A. La figura 8B mostra che la DNA-PKcs è presente, come previsto, nei nuclei e nelle membrane associate ai nuclei (frazione P1), nel citosol (frazione S3) e nella frazione arricchita in reticolo endoplasmatico e Golgi (frazione P3) di ippocampo e corteccia murini, mentre non è rilevabile nella vescicole sinaptiche (frazione LP2). Inaspettatamente, la DNA-PKcs è stata rilevata anche nella frazione LP1, frazione arricchita di membrane sinaptiche. Al fine di verificare la purezza delle preparazioni subcellulari effettuate e confermare i risultati ottenuti, abbiamo analizzato la presenza di alcuni marcatori proteici di specifici compartimenti, quali la proteina delle densità postsinaptiche 95 (PSD 95) e le subunità NR1 del recettore NMDA e GluR1 del recettore AMPA nelle membrane sinaptiche (LP1) e la proteina SNAP25 nelle vescicole sinptiche (LP2) (Figura 8C).

I risultati ottenuti mostrano per la prima volta che la DNA-PKcs è presente nelle membrane sinaptiche della corteccia e dell'ippocampo e suggeriscono che questa proteina nei neuroni possa svolgere un ruolo compatibile con la localizzazione in tale sede come fosforilare specifici substrati coinvolti nella trasmissione sinaptica.

Per confermare tale ipotesi, considerato che la DNA-PK è in grado di autofosforilarsi *in trans* (Meek et al., 2007), abbiamo per prima cosa verificato se essa fosse dotata di attività chinastica nelle membrane sinaptiche. A tale fine, la proteina isolata dalle frazioni LP1 di omogenati di ippocampo di topo mediante immunoprecipitazione con anticorpi specifici o pull-down con DNA-cellulosa, è stata sottoposta ad un saggio chinastico *in vitro* in presenza di $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. La miscela di

reazione è stata successivamente separata in SDS-PAGE e la presenza di proteine fosforilate visualizzata mediante autoradiografia del gel su opportune lastre fotografiche. L'autoradiogramma in Figura 9A mostra un pattern di bande fosforilate a diverso peso molecolare. Tale pattern di fosforilazione è simile a quello caratterizzato per l'autofosforilazione della DNA-PK purificata da cellule endoteliali umane HeLa (Lees-Miller et al., 1990).

Questo risultato indica che la proteina presente nelle membrane sinaptiche può auto-fosforilarsi e suggerisce pertanto che essa sia in grado di svolgere la sua caratteristica attività chinastica anche in tale compartimento subcellulare.

Al fine di confermare questa ipotesi, abbiamo effettuato un saggio di attività chinastica *in vitro*, analizzando la capacità della DNA-PK, opportunamente isolata dalle frazioni LP1 di omogenati di ippocampo murino, di fosforilare il suo specifico substrato p53 (Lees-Miller et al., 1990) e utilizzando, come controllo positivo, la proteina immunoprecipitata da estratti nucleari di cellule HEK293 (*Human Embryonic Kidney*). I risultati ottenuti mostrano che, sebbene l'enzima purificato da tessuto murino abbia una attività chinastica di gran lunga inferiore a quella presente nelle cellule HEK293, come già riportato per altri tessuti e/o cellule di origine umana (Finnie et al., 1995), la DNA-PK isolata dagli LP1 di ippocampo di topo è in grado di fosforilare p53 (Figura 9B).

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che la DNA-PKcs localizzata nelle membrane sinaptiche conserva la sua caratteristica attività enzimatica e suggeriscono che essa possa in tale sede fosforilare qualche specifico substrato non ancora identificato.

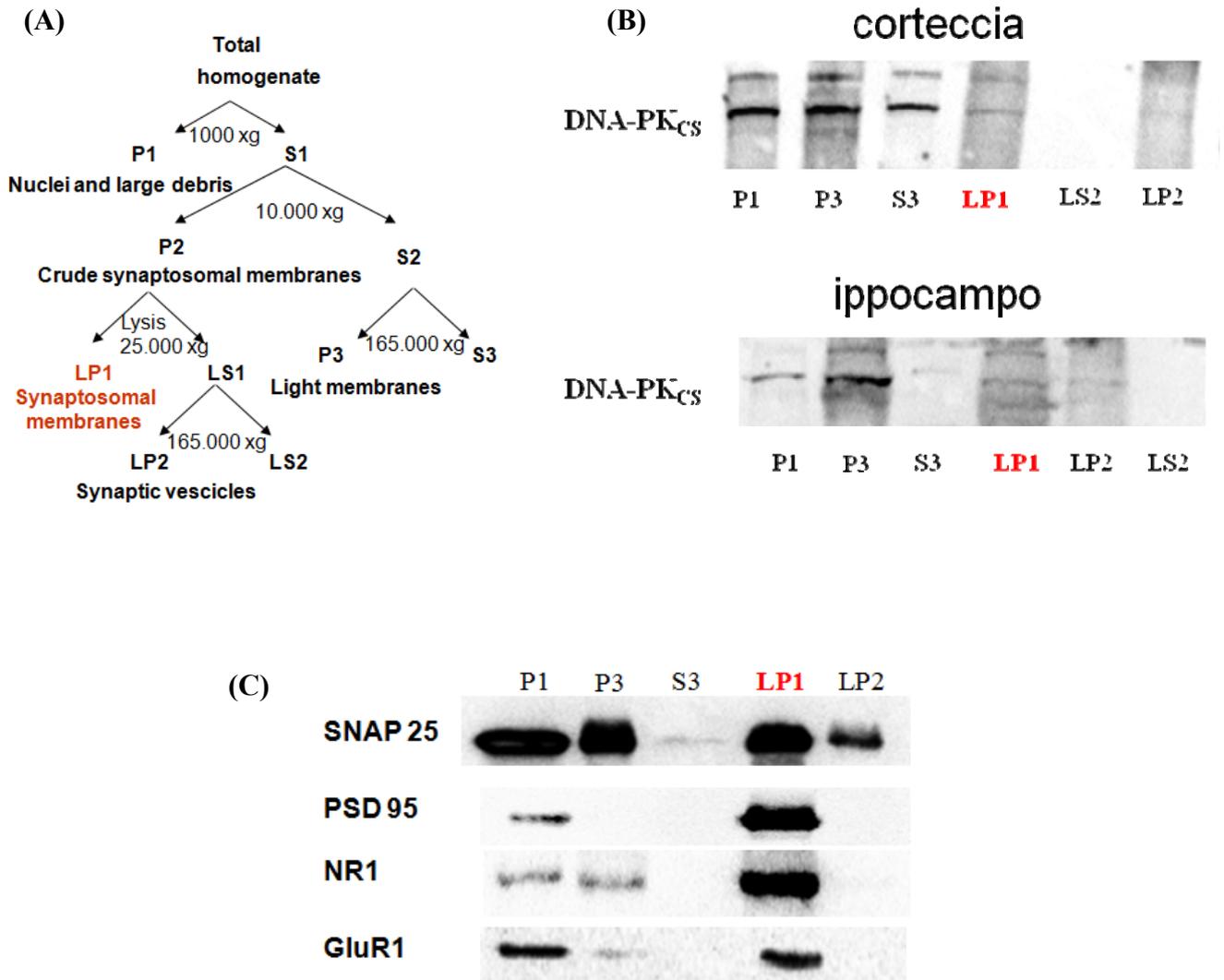


Figura 8. Localizzazione della DNA-PKcs nelle membrane sinaptiche murine.

(A) Schema della procedura sperimentale utilizzata per il frazionamento delle aree cerebrali. (B) Analisi mediante Western Blot della DNA-PKcs nelle varie frazioni subcellulari ottenute da ippocampo e corteccia murini. (C) Analisi della purezza delle varie frazioni subcellulari isolate verificata mediante Western Blot utilizzando marcatori proteici specifici.

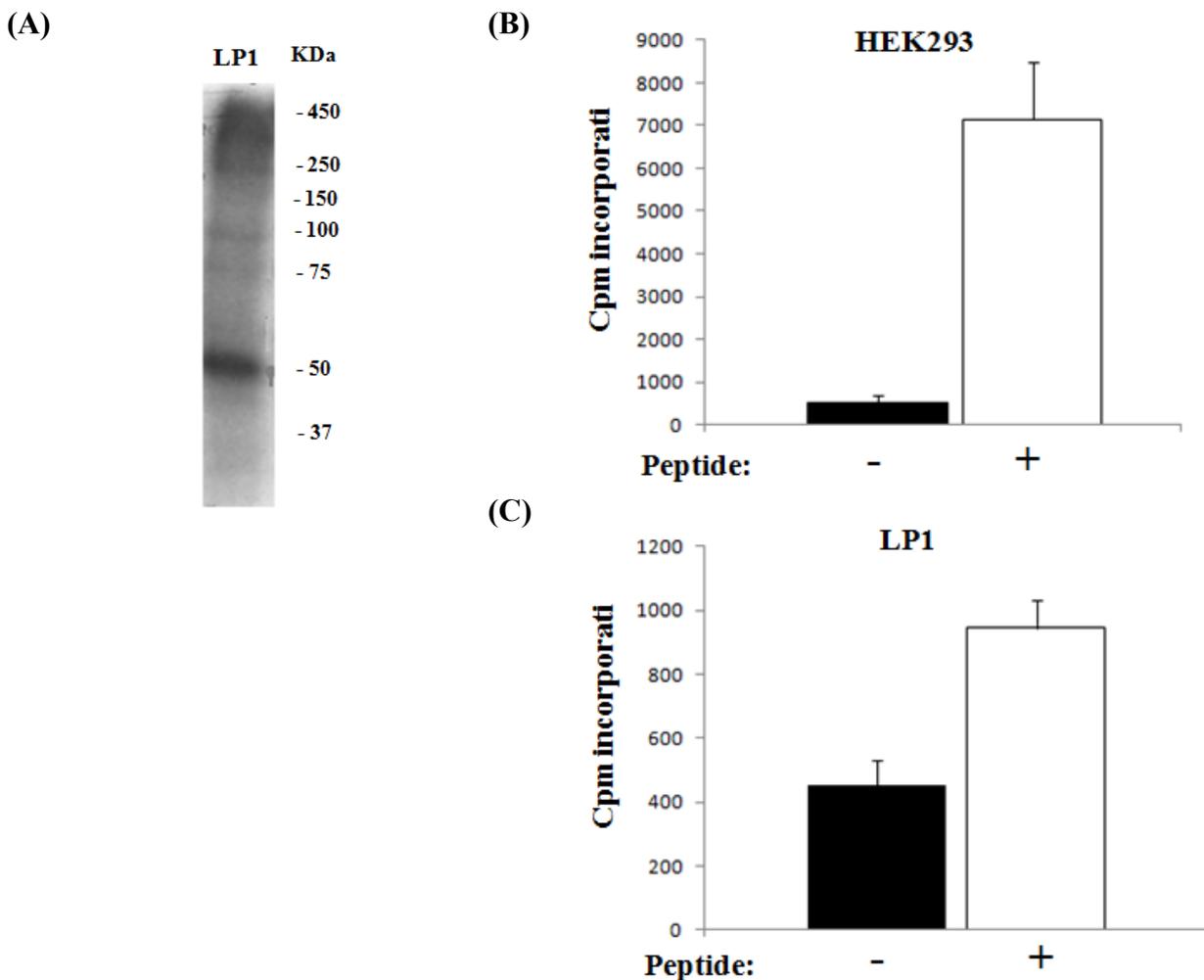


Figura 9. La DNA-PK possiede attività chinastica nelle membrane sinaptiche.

(A) Autoradiogramma che mostra l'autofosforilazione della DNA-PK isolata mediante immunoprecipitazione dalle membrane sinaptiche (frazione LP1) di ippocampi murini. Saggio di attività chinastica della DNA-PK immunoprecipitata da estratti proteici totali di cellule HEK293 (B) e dalla frazione LP1 di ippocampi murini (C). Il saggio di attività chinastica è stato eseguito nei confronti di un peptide sintetico della proteina p53, riconosciuto in modo specifico dalla DNA-PK.

4.8 La DNA-PKcs è associata alle subunità NR1 e NR2A del recettore NMDA ed alla proteina PSD95 nelle membrane sinaptiche

Al fine di identificare il potenziale substrato della serin-treonin chinasi DNA-PKcs nelle membrane sinaptiche, abbiamo verificato la sua possibile interazione con alcune proteine coinvolte nella trasmissione sinaptica, quali i recettori NMDA, i recettori AMPA e la proteina PSD95. Di tali proteine sono note infatti la localizzazione nelle membrane sinaptiche e la suscettibilità della attività

biologica ad eventi fosforilativi (Soderling e Derkach, 2000). Pertanto, abbiamo eseguito esperimenti di co-immunoprecipitazione, isolando con opportuni anticorpi la DNA-PKcs dagli LP1 murini e evidenziando mediante Western Blot l'eventuale co-purificazione dei potenziali substrati. In particolare, abbiamo verificato la possibilità che le subunità NR1, NR2A, NR2B del recettore NMDA e GluR1, GluR2/3 del recettore AMPA e la proteina PSD95 possano legarsi e quindi coimmunoprecipitare con la DNA-PKcs nelle membrane sinaptiche isolate da ippocampo e corteccia di topo. I Western Blot in Figura 10A mostrano che le subunità NR1 e NR2A del recettore NMDA e la proteina PSD95 coimmunoprecipitano con la DNA-PKcs, suggerendo che tali proteine sono in grado di interagire con la chinasi nelle membrane sinaptiche. Al contrario, la subunità NR2B del recettore NMDA e le subunità GluR1 e GluR2/3 del recettore AMPA non coimmunoprecipitano con la chinasi (dati non mostrati). Per confermare la specificità della immunoprecipitazione, abbiamo verificato la presenza della DNA-PKcs nei campioni analizzati, colorando i filtri di nitrocellulosa anche con un anticorpo diretto contro la DNA-PKcs. Gli stessi risultati sono stati infine confermati mediante esperimenti di coimmunoprecipitazione incrociata, immunoprecipitando le proteine NR1, NR2A e PSD-95 e verificando la presenza della DNA-PKcs mediante Western Blot (Figura 10B).

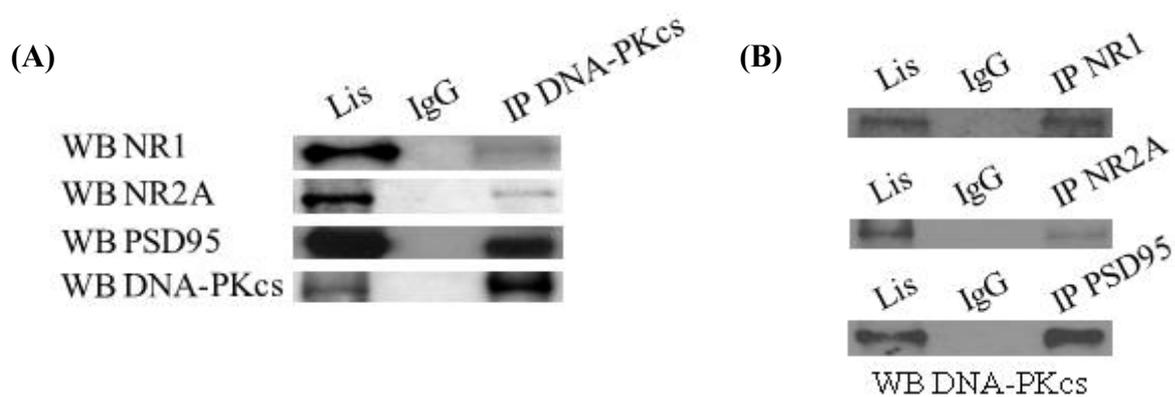


Figura 10. La DNA-PKcs è associata alle subunità NR1 e NR2A del recettore NMDA ed alla proteina PSD95 nelle membrane sinaptiche.

Estratti proteici di LP1 murini sono stati immunoprecipitati con anticorpi diretti contro (A) la DNA-PKcs (IP DNA-PKcs) o (B) contro NMDAR1 (IP NR1), NMDAR2A (IP NR2A) e PSD-95 (IP PSD-95), e IgG non rilevanti (IgG) e analizzati in Western Blot con gli anticorpi che riconoscono le proteine indicate (WB). Il Western Blot è stato eseguito anche, come controllo, su estratti proteici totali (Lys).

4.9 Il potenziamento a lungo termine è compromesso in animali mutanti per la DNA-PKcs

La localizzazione della DNA-PKcs nelle membrane sinaptiche, associata alle subunità NR1 e NR2A dei recettori NMDA e alla proteina PSD95 suggerisce che, nei neuroni, questa chinasi possa essere coinvolta nella trasmissione sinaptica e/o nella plasticità sinaptica, oltre a svolgere la principale funzione di riparazione dei DSBs.

La modulazione della trasmissione sinaptica è vitale per il corretto funzionamento del sistema nervoso e, in associazione alla capacità dei neuroni di creare nuove sinapsi o eliminare quelle già esistenti, è alla base della plasticità sinaptica. La plasticità sinaptica può essere definita come l'abilità delle connessioni sinaptiche di modificare la propria funzionalità. Nelle varie strutture cerebrali la plasticità sinaptica può esistere in molteplici forme, tra cui la facilitazione sinaptica (*paired pulse facilitation*, PPF) e il potenziamento a lungo termine (*long term potentiation*, LTP) sono due classici esempi.

La PPF è definita come un aumento transitorio di efficacia sinaptica che avviene quando due potenziali d'azione raggiungono a breve distanza uno dall'altro, dai 20 a 200 ms, il terminale presinaptico. In questa situazione la risposta evocata nel neurone postsinaptico dalla seconda stimolazione è maggiore rispetto a quella prodotta dalla prima.

L'LTP è un aumento della sensibilità sinaptica che produce, a costanti livelli di stimolazione presinaptica, un incremento considerevole della risposta postsinaptica. Sperimentalmente l'LTP può essere prodotto applicando alla connessione tra due neuroni una stimolazione tetanica: l'arrivo di stimoli successivi, dati a frequenza sufficientemente alta, causano una progressiva e duratura depolarizzazione della cellula, tale da permettere la formazione dell'LTP (Bliss e Lomo, 1973).

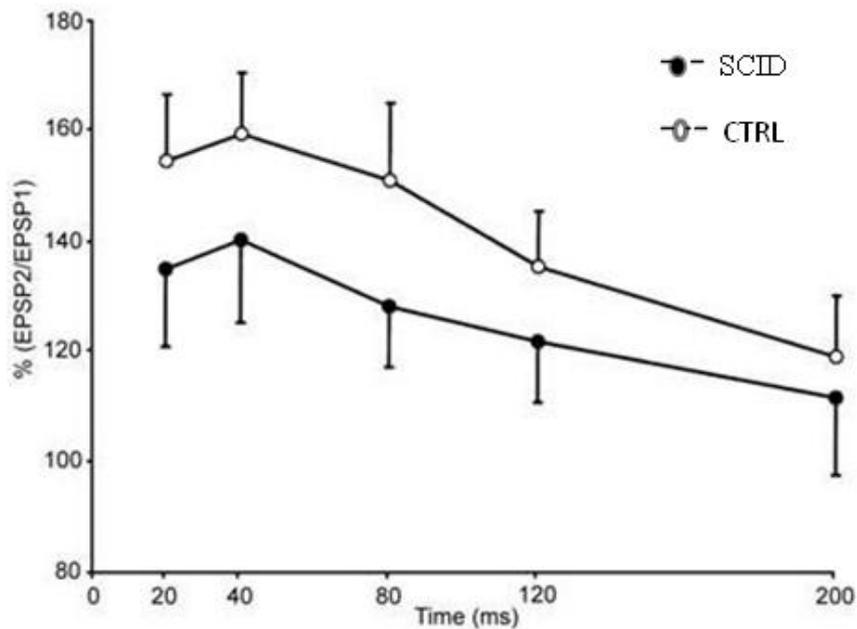
Per verificare un possibile coinvolgimento della DNA-PK nella plasticità sinaptica, sono stati effettuati esperimenti di elettrofisiologia per analizzare la trasmissione sinaptica di base, la facilitazione sinaptica e il potenziamento a lungo a termine, correlati elettrofisiologici dei processi di apprendimento e memoria, nella regione CA1 di fettine di ippocampo sia in topi di controllo che in topi mutanti per la DNA-PKcs (*scid*).

Per verificare la corretta funzionalità della componente presinaptica, abbiamo studiato la PPF in topi di controllo e in topi *scid*. Sperimentalmente la PPF viene indotta mediante un elettrodo di platino posizionato sulle collaterali di Schaffer, producendo due interstimolazioni a 20, 40, 80, 120 e 200 ms l'una dall'altra in modo da evocare, nello strato radiato della regione CA1, la formazione di due potenziali di campo ravvicinati. I rapporti EPSP2/EPSP1 in funzione del tempo di interstimolazione sia in fettine di animali di controllo che in fettine di topi *scid*, sono rappresentati

nella Figura 11A e indicano che non c'è una differenza significativa tra le due condizioni sperimentali.

Mediante registrazioni extracellulari sono state studiate le risposte di gruppi neuronali alla stimolazione elettrica singola o di tipo tetanico. La stimolazione delle vie afferenti in condizioni di controllo induce la comparsa di potenziali post sinaptici eccitatori (excitatory post synaptic potential, pEPSP). La stimolazione tetanica (1s, 100Hz) delle collaterali di Schaffer induce un potenziamento posttetanico (PTP) della durata di alcuni minuti, seguito da un potenziamento persistente anche se meno ampio della trasmissione sinaptica (LTP) della durata di alcune ore. Nel nostro protocollo sperimentale, dopo aver registrato potenziali stabili per 20-30 min, sono state analizzate le eventuali variazioni della risposta a stimolazione tetanica in topi di controllo ed in topi scid. La trasmissione sinaptica di base non risulta variata nei topi scid rispetto ai controlli. Quando viene applicata una stimolazione tetanica sia il potenziamento posttetanico che il potenziamento a lungo termine risultano invece ridotti nei topi scid rispetto ai topi di controllo (Figura 11B).

(A)



(B)

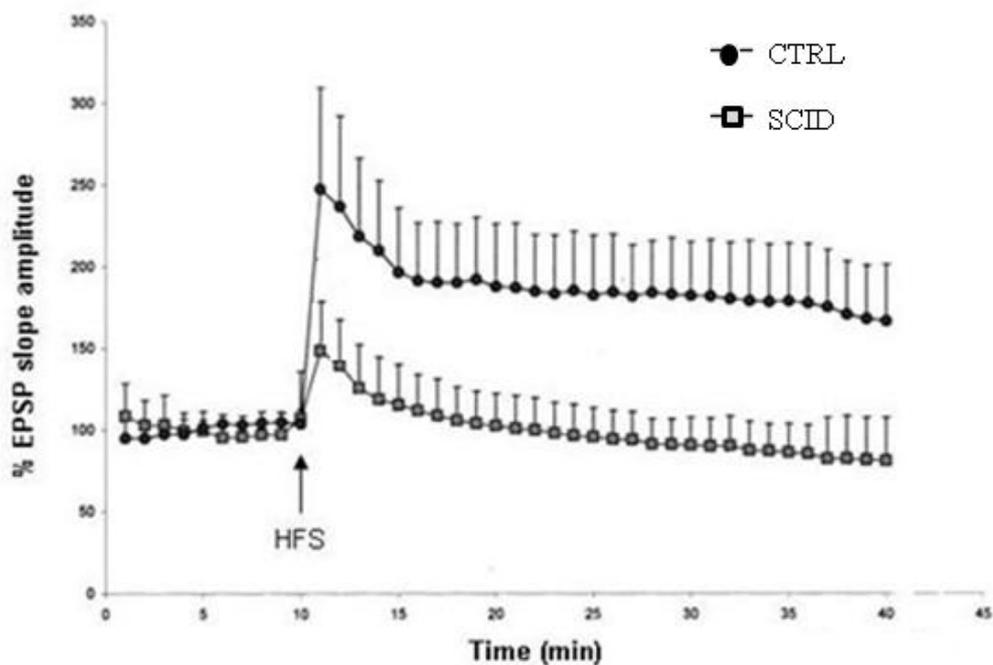


Figura 11. Misura del potenziamento a lungo termine in topi mutanti SCID per la DNA-PKcs.

(A) Confronto della facilitazione sinaptica tra topi scid e topi di controllo. I dati sono espressi come media \pm deviazione standard della facilitazione della seconda risposta rispetto alla prima (controllo $n=6$, scid $n=7$, $p < 0.7$). (B) Effetto della riduzione dell'attività della DNA-PKcs sul potenziamento a lungo termine nella regione CA1 dell'ippocampo. La stimolazione tetanica (1s, 100Hz) delle collaterali di Schaffer induce un potenziamento posttetanico (PTP) seguito dal potenziamento a lungo termine della trasmissione sinaptica (LTP) con differenze statisticamente significative tra topi di controllo e topi scid ($n=15$ per entrambi i genotipi, $p < 0.05$).

5. DISCUSSIONE

Nonostante l'accumulo del danno al DNA sia stato documentato in diverse patologie neurodegenerative come l'AD, il Parkinson e la malattia di Huntington (Barzilai et al., 2008), non è stato ancora chiarito se questo fenomeno sia una conseguenza della compromissione dei sistemi di riparo del DNA e se esiste una relazione causale tra la compromissione di questi sistemi e la neurodegenerazione.

Il principale meccanismo attraverso il quale i neuroni riparano i DSBs, il più letale tra i danni al DNA, è rappresentato dalla riparazione per NHEJ che è mediata dal complesso della DNA-PK.

E' stata precedentemente riportata una significativa diminuzione dei livelli proteici e dell'attività della DNA-PK nella corteccia di pazienti affetti da AD, suggerendo una correlazione tra neurodegenerazione e alterazione dell'attività di NHEJ. Il meccanismo molecolare responsabile della riduzione dell'attività della DNA-PK in AD non è stato ancora identificato.

I nostri risultati dimostrano per la prima volta che l'A β , principale mediatore della degenerazione neuronale caratteristica di AD secondo l'ipotesi della cascata amiloidogena, nella sua forma aggregata è in grado di diminuire i livelli proteici e l'attività chinasi della DNA-PK in un modello cellulare neuronale. Tale effetto si manifesta precocemente, dopo 4 ore di trattamento, e non è causato dall'innescamento del processo apoptotico. Inoltre gli esperimenti "cell free", utilizzando la DNA-PK purificata, dimostrano come l'A β oligomerica, la specie considerata maggiormente neurotossica e sinaptotossica, inibisce l'attività chinasi della DNA-PK indicando che l'interazione diretta con la DNA-PK è un ulteriore meccanismo con cui l'A β contribuisce all'inattivazione di questa chinasi. Un effetto analogo di A β è stato precedentemente riportato per i proteasomi la cui attività proteolitica è direttamente inibita dalle forme oligomeriche e fibrillari dell'A β ma non da quelle monomeriche (Cecarini et al., 2008; Tseng et al., 2008).

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono come lo stress ossidativo contribuisca alla patogenesi dell'AD ed in generale allo sviluppo di diverse malattie neurodegenerative (Andersen 2004). Inoltre, numerosi esperimenti eseguiti su linee cellulari e colture neuronali primarie trattate con il peptide A β , hanno evidenziato come questo peptide eserciti le sue funzioni neurotossiche mediante la produzione di alti livelli di ROS con conseguente danno a carico dei sistemi macromolecolari principali quali lipidi, proteine e acidi nucleici. Studi precedenti hanno dimostrato che i livelli di attività chinasi della DNA-PK sono inversamente correlati con i livelli di ROS prodotti in seguito a trattamento con agenti antitumorali e che il trattamento con antiossidanti è in grado di ripristinare i livelli originali di attività chinasi (Boldogh et al., 2003; Lu et al., 2005). In linea con questi risultati, i nostri esperimenti dimostrano che il trattamento con un agente

antiossidante ripristina l'attività chinasi della DNA-PK suggerendo che l'accumulo di ROS mediato da A β potrebbe contribuire alla neurodegenerazione non solo inducendo lesioni al DNA ma anche inibendo i sistemi per la sua riparazione.

Nel loro insieme questi risultati suggeriscono che l'inattivazione dei meccanismi di riparazione del DNA, nel caso specifico della NHEJ, potrebbe rappresentare un evento precoce nell'ambito della neurotossicità indotta da A β e che il conseguente accumulo di danno non riparato, associato a diverse patologie neurodegenerative, potrebbe innescare il processo di morte neuronale. A tale proposito è stato osservato che colture neuronali ottenute da animali che presentano una inattivazione dei meccanismi di NHEJ (topi scid, mutanti per la DNA-PKcs) sono più sensibili all'apoptosi indotta dal trattamento con beta-amiloide (Culmsee et al, 2001).

Il presente studio indica per la prima volta che la DNA-PKcs nel cervello possa svolgere un ruolo alternativo a quello della riparazione del danno al DNA. Tale ipotesi è supportata da una serie di evidenze sperimentali.

Per prima cosa la DNA-PKcs è localizzata nelle membrane sinaptiche, preparate da corteccia e ippocampo murini, dove è dotata di attività chinasi. Uno studio condotto su diverse linee cellulari non neuronali di mammifero (Lucero et al. 2003) ha precedentemente mostrato che tutte e tre le componenti del complesso della DNA-PK sono localizzate nei raft lipidici, anche se la funzione associata a tale nuova localizzazione non è stata ancora definita. La presenza della DNA-PKcs, così come della sua attività chinasi nelle terminazioni nervose purificate, non solo supporta ulteriormente un ruolo extra nucleare della chinasi, ma soprattutto suggerisce una sua funzione specifica in attività proprie delle cellule nervose, quali la trasmissione sinaptica e la sua modulazione. In linea con questa ipotesi, è stato precedentemente dimostrato che diverse proteine nucleari sono presenti in grande quantità a livello delle densità postsinaptiche (Jordan et al., 2004). Inoltre recenti evidenze hanno mostrato che l'attività chinasi della DNA-PK può essere stimolata anche in assenza di DNA, ad esempio mediante l'interazione con la proteina legante il recettore dell'ormone tiroideo (Ko e Chin, 2003) o la proteina KIP/C1B (Yavuzer et al., 1998).

In secondo luogo, abbiamo osservato che nelle membrane sinaptiche la DNA-PKcs è associata alle subunità NR1 e NR2A dei recettori NMDA e alla proteina delle densità postsinaptiche PSD 95, ma non alle diverse subunità dei recettori AMPA analizzate. La proteina PSD 95, attraverso il caratteristico ripetersi dei domini PDZ, regola la formazione di complessi multiproteici sulla membrana sinaptica ed in particolare determina la localizzazione dei recettori NMDA a livello dei siti postsinaptici. È interessante notare che nella porzione C-terminale della sequenza aminoacidica della DNA-PKcs è presente il caratteristico dominio ESKV con cui la chinasi può interagire con i domini PDZ di proteine bersaglio (Hu et al., 2003; He et al., 2004). In aggiunta la proteina PSD95,

così come le subunità NR1 e NR2A dei recettori NMDA, presentano diverse sequenze consensus (S/TQ) per l'azione fosforilativa della DNA-PK nelle loro porzioni N- e C-terminali, dove la DNA-PK mostra un'attività chinastica preferenziale. Nel loro insieme, queste osservazioni suggeriscono che la DNA-PK possa regolare il traffico intracellulare di queste proteine e/o le proprietà del canale ionico dei recettori NMDA attraverso la loro fosforilazione, modulando quindi la forza delle connessioni sinaptiche, meccanismo alla base di diverse forme di plasticità sinaptica.

Infine, a conferma di quanto sopra proposto, abbiamo dimostrato che in un modello murino deficitario per l'attività chinastica della DNA-PK (topi scid), sia il PTP che l'LTP analizzati nella regione CA1 di fettine di ippocampo, dove l'LTP richiede l'attivazione dei recettori NMDA, risultano ridotti. Questi dati funzionali dimostrano per la prima volta che la DNA-PK, una proteina coinvolta nella riparazione del DNA, può avere un'importante attività regolatoria delle funzioni sinaptiche.

Questo risultato si espone a due possibili diverse interpretazioni. La prima, da noi sostenuta, è che la DNA-PK, in quanto chinasi appartenente alla famiglia delle phosphatidyl 3 kinase-like (PIKKs), gioca un ruolo nel potenziamento a lungo termine nella regione CA1 dell'ippocampo, analogamente a quanto già dimostrato per la PI3-kinase (Sanna et al., 2002), indipendentemente dalla sua funzione di riparazione del DNA. La seconda interpretazione si basa sulle teorie proposte dal gruppo di ricerca di Pena de Ortiz (Colón-Cesario et al., 2006). Questi autori hanno proposto che la ricombinazione del DNA, mediata dalla NHEJ, è un meccanismo che opera nell'ippocampo e media il consolidamento della memoria, almeno nel caso del condizionamento avversivo al contesto (context fear conditioning). Questo meccanismo rappresenterebbe un importante regolatore dell'espressione genica agendo quando nuove informazioni sono acquisite dai neuroni, in modo da generare una varietà di nuove proteine e aumentare la capacità di "storage" della memoria. Gli autori hanno inoltre dimostrato che pochi minuti dopo il condizionamento avversivo al contesto, l'attività di NHEJ nell'ippocampo è aumentata. Pertanto, la DNA-PK, in quanto principale mediatore della NHEJ, potrebbe mediare la ricombinazione del DNA anche in un contesto di potenziamento a lungo termine, correlato elettrofisiologico dei processi di apprendimento e memoria. Sebbene più affascinante, tale possibilità contrasta con il paradigma di LTP da noi utilizzato (definito early-LTP), che è noto essere indipendente dai processi di trascrizione genica e traduzione proteica e quindi indipendente dalla formazione di nuove proteine originatesi mediante ricombinazione del DNA. Al contrario, il fatto che il paradigma di early-LTP si basa essenzialmente su meccanismi di fosforilazione, avvalorava l'ipotesi che la DNA-PK rappresenti una nuova chinasi coinvolta nella plasticità neuronale attraverso la fosforilazione di substrati specifici presenti nelle membrane sinaptiche.

6. BIBLIOGRAFIA

Abramov AY, Canevari L, Duchen MR (2004). "Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase." *J Neurosci* 24(2): 565-75.

Adamec E, Vonsattel JP, Nixon RA (1999). "DNA strand breaks in Alzheimer's disease." *Brain Res* 849(1-2): 67-77.

Amsel A, Rathaus M, Kronman N, Cohen H (2008). "Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13): 5117-22.

Andersen JK (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" *Nat Med* 10 Suppl:S18-25.

Atamna H, Cheung I, Ames BH (2000). "A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2): 686-91.

Barzilai A (2007). "The contribution of the DNA damage response to neuronal viability." *Antioxid Redox Signal* 9(2): 211-8.

Barzilai A, Biton S, Shiloh Y (2008). "The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance." *DNA Repair (Amst)* 7(7): 1010-27.

Bill CA, Grochan BM, Vrdoljak E, Mendoza EA, Tofilon PJ (1992). "Decreased repair of radiation-induced DNA double-strand breaks with cellular differentiation." *Radiat Res* 132(2): 254-8.

Bliss TV and Lomo T (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol* 232(2):331-56.

Boldogh I, Roy G, Lee MS, Bacsi A, Hazra TK, Bhakat KK, Das GC, Mitra S (2003). "Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNA-PKcs activity and low oxidative stress." *Toxicology* 193(1-2):137-52.

Boskovic J, Rivera-Calzada A, D. Maman J, ChacónP, WillisonK, Pear L, Llorca O (2003). "Visualization of DNA-induced conformational changes in the DNA repair kinase DNA-PKcs." *EMBO J* 22(21): 5875-82.

Boulton SJ and Jackson SP (1998). "Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing." *EMBO J* 17(6): 1819-28.

Brooks PJ, Marietta C, Goldman D (1996). "DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons." *J Neurosci* 16(3): 939-45.

Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM (1999). "Mammalian DNA mismatch repair." *Annu Rev Genet* 33: 533-64.

Butterfield DA (2002). "Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review." *Free Radic Res* 36(12):1307-13.

Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A (1995). "DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis." *J Exp Med* 182(6):1625-34.

Cecarini V, Bonfili L, Amici M, Angeletti M, Keller JN, Eleuteri AM (2008). "Amyloid peptides in different assembly states and related effects on isolated and cellular proteasomes." *Brain Res* 1209:8-18.

Chan DW and Lees-Miller SP (1996). "The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit." *J Biol Chem* 271(15):8936-41.

Chan DW, Ye R, Veillette CJ, Lees-Miller SP (1999). "DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer." *Biochemistry* 38(6):1819-28.

Chen L, Liu L, Yin J, Luo Y, Huang S (2009). "Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway." *Int J Biochem Cell Biol* (6):1284-95.

Chmiel NH, Livingston AL, David SS (2003). "Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes." *J Mol Biol* 327(2): 431-43.

Cleaver JE (2005). "Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair." *Nat Rev Cancer* 5(7): 564-73.

Collis S, DeWeese T, Jeggo P, Parker A (2005). "The life and death of DNA-PK." *Oncogene* 24(6): 949-61.

Colón-Cesario M, Wang J, Ramos X, García HG, Dávila JJ, Laguna J, Rosado C, Peña de Ortiz S (2006). "An inhibitor of DNA recombination blocks memory consolidation, but not reconsolidation, in context fear conditioning." *J Neurosci* 26(20):5524-33.

Cotman CW and Su JH (1996). "Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease." *Brain Pathol* 6(4): 493-506.

Culmsee C, Bondada S, Mattson MP (2001). "Hippocampal neurons of mice deficient in DNA-dependent protein kinase exhibit increased vulnerability to DNA damage, oxidative stress and excitotoxicity." *Brain Res Mol Brain Res* 87(2): 257-62.

Curti D, Rognoni F, Gasparini L, Cattaneo A, Paolillo M, Racchi M, Zani L, Bianchetti A, Trabucchi M, Bergamaschi S, Govoni S (1997). "Oxidative metabolism in cultured fibroblasts derived from sporadic Alzheimer's disease (AD) patients." *Neurosci Lett* 236(1): 13-6.

Davydov V, Hansen LA, Shackelford DA (2003). "Is DNA repair compromised in Alzheimer's disease?" *Neurobiol Aging* 24(7): 953-68.

de la Monte SM, Luong T, Neely TR, Robinson D, Wands JR (2000). "Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease." *Lab Invest* 80(8): 1323-35.

De Wind N, Dekker M, van Rossum A, van der Valk M, te Riele H (1998). "Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Cancer Res* 58(2): 248-55.

Dip R and Naegeli H (2005). "More than just strand breaks: the recognition of structural DNA discontinuities by DNA-dependent protein kinase catalytic subunit." *FASEB J* 19(7): 704-15.

Dou H, Mitra S, Hazra TK (2003). "Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2." *J Biol Chem* 278(50): 49679-84.

Dunah, AW and Standaert G (2001). "Dopamine D1 Receptor-Dependent Trafficking of Striatal NMDA Glutamate Receptors to the Postsynaptic Membrane." *J Neurosci* 21(15):5546–5558

Edwards JA, Wang LG, Setlow RB, Kaminskas E (1989). "O6-methylguanine-DNA methyltransferase in lymphocytes of the elderly with and without Alzheimer's disease." *Mutat Res* 219(5-6): 267-72.

Eker AP, Quayle C, Chaves I, van der Horst GT (2009). "DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems." *Cell Mol Life Sci* 66(6): 968-80.

Endres M, Biniszkiwicz D, Sobol RW, Harms C, Ahmadi M, Lipski A, Katchanov J, Mergenthaler P, Dirnagl U, Wilson SH, Meisel A, Jaenisch R. (2004). "Increased postischemic brain injury in mice deficient in uracil-DNA glycosylase." *J Clin Invest* 113(12): 1711-21.

Espejel S, Klatt P, Ménessier-de Murcia J, Martín-Caballero J, Flores JM, Taccioli G, de Murcia G, Blasco MA (2004). "Impact of telomerase ablation on organismal viability, aging, and tumorigenesis in mice lacking the DNA repair proteins PARP-1, Ku86, or DNA-PKcs." *J Cell Biol* 167(4): 627-38.

Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR (2007). "DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair?" *Mutat Res* 614(1-2): 24-36.

Finnie NJ, Gottlieb TM, Blunt T, Jeggo PA, Jackson SP (1995). "DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(1):320-4.

Fortini P and Dogliotti E (2007). "Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways." *DNA Repair (Amst)* 6(4): 398-409.

Frumerie C, Eriksson J, Dugast M, Haggård-Ljungquist E (2005). "Dimerization of bacteriophage P2 integrase is not required for binding to its DNA target but for its biological activity." *Gene* 344: 221-31.

Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR (1998). "Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 71(5): 2034-40.

Gillet LC and Scharer OD (2006). "Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair." *Chem Rev* 106(2): 253-76.

Gobbel GT, Bellinzona M, Vogt AR, Gupta N, Fike JR, Chan PH (1998). "Response of postmitotic neurons to X-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis." *J Neurosci* 18(1): 147-55.

Gottlieb TM and Jackson SP (1993). "The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen." *Cell* 72(1): 131-42.

Guirouilh-Barbat J, Redon C, Pommier Y (2008). "Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." *Mol Biol Cell* 19(9): 3969-81.

Halliwell B (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" *J Neurochem* 97(6): 1634-58.

Hammarsten O and Chu G (1998). "DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2): 525-30.

Hartley KO, Gell D, Smith GC, Zhang H, Divecha N, Connelly MA, Admon A, Lees-Miller SP, Anderson CW, Jackson SP (1995). "DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product." *Cell* 82(5): 849-56.

Hoeijmakers JH (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* 411(6835): 366-74.

He J, Bellini M, Xu J, Castleberry AM, Hall RA (2004). "Interaction with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand (CAL) inhibits beta1-adrenergic receptor surface expression." *J Biol Chem.* 279(48):50190-6.

Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, Zurer I, Rotter V, Samson LD, Harris CC (2003). "The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation." *J Clin Invest* 112(12): 1887-94.

Hu LA, Chen W, Martin NP, Whalen EJ, Premont RT, Lefkowitz RJ (2003). "GIPC interacts with the beta1-adrenergic receptor and regulates beta1-adrenergic receptor-mediated ERK activation." *J Biol Chem* 278(28):26295-301.

Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999). "The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction." *Biochemistry* 38(24): 7609-16.

Huston E, Lynch MJ, Mohamed A, Collins DM, Hill EV, MacLeod R, Krause E, Baillie GS, Houslay MD (2008). "EPAC and PKA allow cAMP dual control over DNA-PK nuclear translocation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 12791-6.

Iida T, Furuta A, Nishioka K, Nakabeppu Y, Iwaki T (2002). "Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain." *Acta Neuropathol* 103(1): 20-5.

Ito K, Takubo K, Arai F, Satoh H, Matsuoka S, Ohmura M, Naka K, Azuma M, Miyamoto K, Hosokawa K, Ikeda Y, Mak TW, Suda T, Hirao A (2007). "Regulation of reactive oxygen species by Atm is essential for proper response to DNA double-strand breaks in lymphocytes." *J Immunol* 178(1): 103-10.

Itzhaki RF (1994). "Possible factors in the etiology of Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol* 9(1-3): 1-13.

Jackson SP and Bartek J (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." *Nature* 461(7267): 1071-8.

Jacobsen E, Beach T, Shen Y, Li R, Chang Y (2004). "Deficiency of the Mre11 DNA repair complex in Alzheimer's disease brains." *Brain Res Mol Brain Res* 128(1): 1-7.

Jin S and Weaver DT (1997). "Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions." *EMBO J* 16(22):6874-85.

Jones JM, Gellert M, Yang W (2001). "A Ku bridge over broken DNA." *Structure* 9(10): 881-4.

Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP (2002). "Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations." *Hum Mol Genet* 11(23): 2961-7.

Jones SK, Nee LE, Sweet L, Polinsky RJ, Bartlett JD, Bradley WG, Robison SH (1989). "Decreased DNA repair in familial Alzheimer's disease." *Mutat Res* 219(4): 247-55.

Jordan BA, Fernholz BD, Boussac M, Xu C, Grigorean G, Ziff EB, Neubert TA (2004). "Identification and Verification of Novel Rodent Postsynaptic Density Proteins." *Molecular and Cellular Proteomics* 3:857-871

Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat KA (2004). "Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease." *Biomarkers* 9(2): 203-9.

Kaminsky YG, Marlatt MW, Smith MA, Kosenko EA (2009). "Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for Abeta(25-35)." *Exp Neurol*. [Epub ahead of print]

Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann JR, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Muller WE, Eckert A (2004a). "Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis." *J Biol Chem* 279(48): 50310-20.

Keil U, Bonert A, Marques CA, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Muller WE, Eckert A (2004b). "Elevated nitric oxide production mediates beta-amyloid-induced mitochondria failure." *Pol J Pharmacol* 56(5): 631-4.

Kennedy RD and D'Andrea AD (2005). "The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd." *Genes Dev* 19(24): 2925-40.

Kinsella TJ, Dobson PP, Fornace AJ Jr, Barrett SF, Ganges MB, Robbins JH (1987). "Alzheimer's disease fibroblasts have normal repair of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA damage determined by the alkaline elution technique." *Biochem Biophys Res Commun* 149(2): 355-61.

Kirkwood TB and Austad SN (2000). "Why do we age?" *Nature* 408(6809): 233-8.

Ko L and Chin WW (2003). "Nuclear receptor coactivator thyroid hormone receptor-binding protein (TRBP) interacts with and stimulates its associated DNA-dependent protein kinase." *J Biol Chem*. 278(13):11471-9.

Koike M (2002). "Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins." *J Radiat Res (Tokyo)* 43(3): 223-36.

Koike M, Shiomi T, Koike A (2001). "Dimerization and nuclear localization of ku proteins." *J Biol Chem* 276(14): 11167-73.

Korr H, Thorsten Rohde H, Benders J, Dafotakis M, Grolms N, Schmitz C (2001). "Neuron loss during early adulthood following prenatal low-dose X-irradiation in the mouse brain." *Int J Radiat Biol* 77(5): 567-80.

Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP (2002). "Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 22(5): 1752

Kruman II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R Jr, Gorospe M, Mattson MP (2004). "Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage." *Neuron* 41(4): 549-61.

Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM (1995). "Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ." *Acta Neuropathol* 89(1): 35-41.

LeDoux SP, Druzhyna NM, Hollensworth SB, Harrison JF, Wilson GL (2007). "Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults." *Neuroscience* 145(4): 1249-59.

Lee J, Blanco L, Zhou T, Garcia-Diaz M, Bebenek K, Kunkel T, Wang Z, Povirk L (2004). "Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts." *J Biol Chem* 279(1): 805-11.

Lee SH and Kim CH (2002). "DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint." *Mol Cells* 13(2): 159-66.

Lees-Miller SP, Chen YR, Anderson CW (1990). "Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen." *Mol Cell Biol* 10(12):6472-81.

Leuther KK, Hammarsten O, Kornberg RD, Chu G (1999). "Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA." *EMBO J* 18(5): 1114-23.

Li D, Zhang W, Sahin AA, Hittelman WN (1999). "DNA adducts in normal tissue adjacent to breast cancer: a review." *Cancer Detect Prev* 23(6): 454-62.

Lieber MR (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." *J Biol Chem* 283(1): 1-5.

Lindahl T (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." *Nature* 362(6422): 709-15.

Link CJ Jr, Robbins JH, Bohr VA (1995). "Gene specific DNA repair of damage induced in familial Alzheimer disease cells by ultraviolet irradiation or by nitrogen mustard." *Mutat Res* 336(2): 115-21.

Love S, Barber R, Wilcock GK (1999). "Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease." *Brain* 122 (Pt 2): 247-53.

Lovell MA, Gabbita SP, Markesbery WR (1999). "Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF." *J Neurochem* 72(2): 771-6.

Lovell MA, Xie C, Markesbery WR (2000). "Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain." *Brain Res* 855(1): 116-23.

Lu HR, Zhu H, Huang M, Chen Y, Cai YJ, Miao ZH, Zhang JS, Ding J (2005). "Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently disrupting topoisomerase II and DNA-dependent protein kinase." *Mol Pharmacol.* 68(4):983-94.

Lucassen PJ, Chung WCJ, Kamphorst W, Swaab DF (1997). "DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ end labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer disease in the absence of apoptotic morphology." *J Neuropathol Exp Neurol* 56(8): 887-900.

Lucero H, Gae D, Taccioli GE (2003). "Novel localization of the DNA-PK complex in lipid rafts: a putative role in the signal transduction pathway of the ionizing radiation response." *J Biol Chem* 278(24):22136-43.

Mahajan K, McElhinny N, Mitchell B, Ramsden D (2002). "Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair." *Mol Cell Biol* 22(14): 5194-202.

McCombe P, Lavin M, Kidson C (1976). "Control of DNA repair linked to neuroblastoma differentiation," *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 29(6): 523-31.

McConnell KR, Dynan WS, Hardin JA (1997). "The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (p460) is cleaved during Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells." *J Immunol* 158(5):2083-9.

- McKinnon PJ (2009). "DNA repair deficiency and neurological disease." *Nat Rev Neurosci* 10(2): 100-12.
- McMurray CT (2005). "To die or not to die: DNA repair in neurons." *Mutat Res* 577(1-2): 260-74.
- McVey M and Lee SE (2008). "MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings." *Trends Genet* 24(11): 529-38.
- Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, Senin U (1994). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 36(5): 747-51.
- Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, Senin U (1998). "Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients." *Neurology* 51(4): 1014-7.
- Meek K, Gupta S, Ramsden D, Lees-Miller S (2004). "The DNA-dependent protein kinase: the director at the end." *Immunol Rev* 200: 132-41.
- Meek K, Douglas P, Cui X, Ding Q, Lees-Miller SP (2007). "trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining." *Mol Cell Biol* 27(10):3881-90.
- Merlo D, Di Stasi AM, Bonini P, Mollinari C, Cardinale A, Cozzolino F, Wisden W, Garaci E (2005). "DNA repair in post-mitotic neurons: a gene-trapping strategy". *Cell Death Differ* 12(3):307-9.
- Migliore L, Fontana I, Trippi F, Colognato R, Coppedè F, Tognoni G, Nucciarone B, Siciliano G (2005). "Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients." *Neurobiol Aging* 26(5): 567-73.
- Mitchell JR, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ (2003). "Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing." *Curr Opin Cell Biol* 15(2): 232-40.

Mizuta R, Cheng HL, Gao Y, Alt FW (1997). "Molecular genetic characterization of XRCC4 function." *Int Immunol* 9(10):1607-13.

Modesti M, Hesse JE, Gellert M. (1999). "DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity." *EMBO J* 18(7):2008-18.

Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA. (2002). "Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain." *Amyloid* 9(2): 88-102.

Mórocz M, Kálmán J, Juhász A, Sinkó I, McGlynn AP, Downes CS, Janka Z, Raskó I (2002). "Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 23(1): 47-53.

Morrison JH and Hof PR (2002). "Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease." *Prog Brain Res* 136: 467-86.

Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP (2001). "Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency." *Cell* 105(2):177-86.

Mullaart E, Boerrigter ME, Ravid R, Swaab DF, Vijg J. (1990). "Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients." *Neurobiol Aging* 11(3): 169-73.

Mutisya EM, Bowling AC, Beal MF. (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 63(6): 2179-84.

Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY (2002). "Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease." *Neuroscience* 110(2):199-211.

Nospikel T (2007). "DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions." *Neuroscience* 145(4): 1213-21.

Nospikel T and Hanawalt P C (2000). "Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression." *Mol Cell Biol* 20(5): 1562-70.

Nospikel T and Hanawalt P C (2002). "DNA repair in terminally differentiated cells." *DNA Repair (Amst)* 1(1): 59-75.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." *Neuron* 39(3): 409-21.

Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM. (2006). "A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta." *Am J Pathol* 168(1): 184-94.

Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, White AR, Cappai R, Masters CL, Tanzi RE, Inestrosa NC, Bush AI. (2002). "Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂." *J Biol Chem* 277(43): 40302-8.

Parshad RP, Sanford KK, Price FM, Melnick LK, Nee LE, Schapiro MB, Tarone RE, Robbins JH (1996). "Fluorescent light-induced chromatid breaks distinguish Alzheimer disease cells from normal cells in tissue culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 5146-50.

Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state." *J Neurosci.* 13(4):1676-87.

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (1995). "Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity." *J Neurochem* 64(1):253-65.

Rao K S (1993). "Genomic damage and its repair in young and aging brain." *Mol Neurobiol* 7(1): 23-48.

Ren K and Pena de Ortiz S (2002). "Non-homologous DNA end joining in the mature rat brain." *J Neurochem* 80(6): 949-59.

Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M (2004). "A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci." *Mol Cell* 16(5):715-24.

Rivera-Calzada A, Maman JD, Spagnolo L, Pearl LH, Llorca O (2005). "Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)." *Structure* 13(2): 243-55.

Robbins, J H (1987). "Parkinson's disease, twins, and the DNA-damage hypothesis." *Ann Neurol* 21(4): 412.

Robbins JH, Otsuka F, Tarone RE, Polinsky RJ, Brumback RA, Nee LE (1985). "Parkinson's disease and Alzheimer's disease: hypersensitivity to X rays in cultured cell lines." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48(9): 916-23.

Robison SH, Munzer JS, Tandan R, Bradley WG (1987). "Alzheimer's disease cells exhibit defective repair of alkylating agent-induced DNA damage." *Ann Neurol* 21(3): 250-8.

Rooney S, Sekiguchi J, Zhu C, Cheng HL, Manis J, Whitlow S, DeVido J, Foy D, Chaudhuri J, Lombard D, Alt FW (2002). "Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice." *Mol Cell* 10(6):1379-90.

Rolig, RL and McKinnon PJ(2000). "Linking DNA damage and neurodegeneration." *Trends Neurosci* 23(9): 417-24.

Rothstein R, Michel B, Gangloff S. (2000). "Replication fork pausing and recombination or "gimme a break"." *Genes Dev* 14(1): 1-10.

Rutten BP, Korr H, Steinbusch HW, Schmitz C. (2003). "The aging brain: less neurons could be better." *Mech Ageing Dev* 124(3): 349-55.

- Rutten BP, Schmitz C, Gerlach OH, Oyen HM, de Mesquita EB, Steinbusch HW, Korr H. (2007). "The aging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss?" *Neurobiol Aging* 28(1): 91-8.
- San Filippo J, Sung P, Klein H (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." *Annu Rev Biochem* 77: 229-57.
- Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutjens R, Bloom FE, Francesconi W (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region." *J Neurosci* 22(9):3359-65.
- Santiard-Baron D, Lacoste A, Ellouk-Achard S, Soulié C, Nicole A, Sarasin A, Ceballos-Picot I. (2001). "The amyloid peptide induces early genotoxic damage in human preneuron NT2." *Mutat Res* 479(1-2): 113-20.
- Saavedra L, Mohamed A, Ma V, Kar S, de Chaves EP (2007). "Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E." *J Biol Chem* 282(49):35722-32.
- Scudiero DA, Polinsky RJ, Brumback RA, Tarone RE, Nee LE, Robbins JH. (1986). "Alzheimer disease fibroblasts are hypersensitive to the lethal effects of a DNA-damaging chemical." *Mutat Res* 159(1-2): 125-31.
- Shackelford, DA (2006). "DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 27(4): 596-605.
- Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL (1994). "Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(4):1470-4.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, et al (1992). "Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing." *Science* 258(5079): 126-9.
- Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE Jr (1995). "Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease." *Exp Neurol* 133(2): 225-30.

Soderling TR and Derkach VA (2000). "Postsynaptic protein phosphorylation and LTP." Trends Neurosci 23(2):75-80.

Song Q, Lees-Miller SP, Kumar S, Zhang Z, Chan DW, Smith GC, Jackson SP, Alnemri ES, Litwack G, Khanna KK, Lavin MF (1996). "DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis." EMBO J 15(13):3238-46.

Spagnolo L, Rivera-Calzada A, Pearl LH, Llorca O (2006). "Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair." Mol Cell 22(4): 511-9.

Stadelmann C, Brück W, Bancher C, Jellinger K, Lassmann H (1998). "Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis." J Neuropathol Exp Neurol 57(5): 456-64.

Stadtman ER (1993). "Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions." Ann Rev Biochem 62:797.

Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003). "In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid-Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis." J Biol Chem 278(13): 11612-11622.

Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW. (1994). "Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease." Neuroreport 5(18): 2529-33.

Suram A, Hegde ML, Rao KS. (2007). "A new evidence for DNA nicking property of amyloid beta-peptide (1-42): relevance to Alzheimer's disease." Arch Biochem Biophys 463(2): 245-52.

Tan Z, Sun N, Schreiber SS (1998). "Immunohistochemical localization of redox factor-1 (Ref-1) in Alzheimer's hippocampus." Neuroreport 9(12): 2749-52.

Tofilon P J and Meyn R E(1988). "Reduction in DNA repair capacity following differentiation of murine proadipocytes." Exp Cell Res 174(2): 502-10.

Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007). "Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway." *J Biol Chem* 282(46):33305-12.

Toyokuni S, Iwasa Y, Kondo S, Tanaka T, Ochi H, Hiai H (1999). "Intranuclear distribution of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. An immunocytochemical study." *J Histochem Cytochem* 47(6): 833-6.

Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M, LaFerla FM (2008). "Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation." *Neurobiol Aging* 29(11): 1607-18.

Vyjayanti VN and Rao K S(2006). "DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons." *Neurosci Lett* 393(1): 18-22.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001). "Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair." *Nature* 412(6847): 607-14.

Walsh DM and Selkoe DJ (2007). "A beta oligomers - a decade of discovery." *J Neurochem* 101(5): 1172-84.

Wang J, Markesbery WR, Lovell MA (2006). "Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment." *J Neurochem* 96(3): 825-32.

Weissman L, de Souza-Pinto NC, Mattson MP, Bohr VA (2009). "DNA base excision repair activities in mouse models of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 30(12): 2080-1.

Weissman L, de Souza-Pinto NC, Stevnsner T, Bohr VA (2007). "DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration." *Neuroscience* 145(4): 1318-29.

Weterings, E and Chen DJ(2008). "The endless tale of non-homologous end-joining." *Cell Res* 18(1): 114-24.

Wilson DM 3rd and McNeill D R (2007). "Base excision repair and the central nervous system." *Neuroscience* 145(4): 1187-200.

Wong RH, Chang I, Hudak CS, Hyun S, Kwan HY, Sul HS (2009). "A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin." *Cell* 136(6): 1056-72.

Wu X and Lieber MR (1996). "Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86." *Mol Cell Biol* 16(9):5186-93.

Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989). "Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease." *Science*. 1989 Jul 28;245(4916):417-20.

Yavuzer U, Smith GC, Bliss T, Werner D, Jackson SP (1998). "DNA end-independent activation of DNA-PK mediated via association with the DNA-binding protein C1D." *Genes Dev* 12(14): 2188-99.

Zhou BB and Elledge SJ (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." *Nature* 408(6811): 433-9.

Desidero ringraziare la Dott.ssa Daniela Merlo che mi ha accolto nel suo gruppo e mi ha sempre consigliato nei momenti di difficoltà. Vorrei inoltre ringraziare il Dott. Alessio Cardinale che mi ha seguito sin dall'inizio del mio dottorato cercando sempre di stimolare il mio interesse verso la ricerca e insegnandomi a lavorare al bancone. Vorrei infine ringraziare tutte le persone che direttamente o indirettamente hanno contribuito alla mia formazione durante questi anni di dottorato.