

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**“AMEDEO AVOGADRO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche**

**TESI DI LAUREA**

*Analisi Real Time PCR in progenitori neurali ipotalamici*

*derivati da un modello murino di malattia di Alzheimer*

**Relatrice**

**Prof. ssa Mariagrazia Grilli**

**Candidato**

**Federico Nicastro**

**SESSIONE ESTIVA A.A. 2023/2024**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE**

**“AMEDEO AVOGADRO”**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche**

**TESI DI LAUREA**

*Analisi Real Time PCR in progenitori neurali ipotalamici*

*derivati da un modello murino di malattia di Alzheimer*

**Relatrice**

**Prof. ssa Mariagrazia Grilli**

**Candidato**

**Federico Nicastro**

**SESSIONE ESTIVA A.A. 2023/2024**

# Indice

<b>Lista delle abbreviazioni .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Introduzione .....</b>	<b>7</b>
1.1 La malattia di Alzheimer .....	7
1.2 La neurogenesi adulta .....	11
1.2.1 Le nicchie neurogeniche.....	12
1.2.2 La neurogenesi adulta nell'ipotalamo .....	15
1.3 La neurogenesi adulta nella malattia di Alzheimer .....	20
1.4 Il processo di degradazione di APP .....	22
1.4.1 L'aumentata regolazione di ADAM10 nella malattia di Alzheimer .....	24
1.5 Il modello murino APP/PS1 per lo studio della malattia di Alzheimer .....	25
1.6 Proteine rilevanti coinvolte nella Malattia di Alzheimer e/o nella regolazione della neurogenesi .....	26
1.6.1 AP-2 .....	26
1.6.2 EGFR .....	26
1.6.3 SPOT14 .....	27
1.6.4 $\alpha 2\delta 1$ .....	27
1.6.5 GLT-1 .....	28
1.6.6 GluR2 .....	28
1.6.7 mGluR3 .....	29
<b>2. Scopo del lavoro.....</b>	<b>30</b>
<b>3. Materiali e metodi .....</b>	<b>32</b>
3.1 Estrazione dell'mRNA da pellet di NPC's ipotalamiche. ....	32
3.2 Retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA .....	33
3.3 RealTime-qPCR.....	34

3.4	Analisi statistica .....	36
<b>4.</b>	<b>Risultati .....</b>	<b>37</b>
4.1	Analisi dei trascritti di ADAM10 e AP-2 in progenitori ipotalamici derivati da topi wild type e APP/PS1 .....	37
4.2	Analisi di trascritti coinvolti nella regolazione della neurogenesi adulta in NPC's ipotalamiche derivate da topi WT e APP/PS1 .....	39
4.3	Analisi di trascritti coinvolti nella omeostasi del glutammato in progenitori neurali ipotalamici derivati da topi WT e APP/PS1 .....	42
<b>5.</b>	<b>Discussione e conclusioni.....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>49</b>

# Lista delle abbreviazioni

A $\beta$  = Amyloid-beta

A $\beta$ 40 = Isoforma del frammento di APP di 40 amminoacidi

A $\beta$ 42 = Isoforma del frammento di APP di 42 amminoacidi

AD = Alzheimer's disease

ADAM = A disintegrin and metalloproteinase

AHN = Adult hippocampal neurogenesis

AICD = Amyloid intracellular domain

ApoE = Apolipoproteina E

APP = Amyloid precursor protein

BDNF = Brain-derived neurotrophic factor

BMP = Bone morphogenic protein

BrdU = Bromodeossiuridina

CCE = Cell cycle exit

CNTF = Ciliary neurotrophic factor

DCX = Doublecortin

DG = Dentate gyrus

EOAD = Early onset Alzheimer's disease

EGF = Epidermal growth factor

EGFR = Epidermal growth factor receptor

FAD = Familial Alzheimer's disease

FGF-2 = Basic fibroblast growth factor

GCL = Granule cells layer

GFAP = Glial fibrillary acidic protein

HFD = High-fat diet

IRX = Iroquois-class homeodomain protein

LOAD = Late onset Alzheimer's disease

MCH = Melanin concentrating hormone

NPC = Neural progenitor cell

NSC = Neural stem cell

NSE = Neuron specific enolase

POMC<sup>ARC</sup> = Pro-opiomelanocortinici del nucleo arcuato

PS-1 = Presenilina 1

PWS = Primer working solution

RGL = Radial glial-like cell

SD = Standard deviation

SNC = Sistema nervoso centrale

SGZ = Sub-granular zone

SVZ = Sub-ventricular zone

VEGF = Vascular endothelial growth factor

VGCC = Voltage-gated calcium channels

VTA = Ventral tegmental area

WT = Wild-type

# 1. Introduzione

## 1.1 La malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia neurodegenerativa e la più diffusa forma di demenza. Si stima che dei circa 55 milioni di pazienti che soffrono di demenza in tutto il mondo oltre il 60% soffra di AD, con numeri destinati a triplicarsi entro il 2050, anno in cui, complice anche il progressivo invecchiamento della popolazione, secondo l'OMS il numero di persone affette da demenza sfiorerà i 140 milioni (World-Alzheimer-Report-2023).

L'AD ha generalmente un decorso piuttosto lungo: si stima che per un individuo di 70 anni si abbiano 10 anni di fase pre-clinica, con sintomi cognitivi lievi o addirittura assenti, 4 anni di fase prodromica, in cui si possono presentare sintomi cognitivi come il Disturbo Cognitivo Lieve che comunque permettono lo svolgersi delle attività quotidiane senza particolari problemi, e 6 anni di demenza vera e propria in cui i sintomi della malattia non permettono il normale svolgimento delle attività quotidiane (Vermunt et al., 2019; Scheltens et al., 2021).

Esistono diverse varianti dell'AD, ognuna con fattori di rischio e quadro clinico differente. Le due varianti principali sono AD ad esordio tardivo (LOAD) e AD ad esordio precoce (EOAD). La variante ad esordio tardivo è la più diffusa, e la diagnosi avviene solitamente ad un'età superiore ai 65 anni; il LOAD ha fra i principali fattori di rischio eventi vascolari, traumi cerebrali, il sesso femminile (le donne hanno probabilità doppia rispetto agli uomini di contrarre AD in età > 65 anni). Anche fattori genetici possono giocare un ruolo fondamentale nell'esordio del LOAD: il fattore di rischio genetico più importante è la presenza dell'allele APOE $\epsilon$ 4, codificante per l'apolipoproteina E. Il LOAD è caratterizzato da una progressiva alterazione della memoria e compromissione del linguaggio, gravi difficoltà nell'apprendimento e segni di disfunzione ippocampale. Possono essere presenti sintomi neuropsichiatrici quali depressione, ansia, apatia, agitazione, cambi di personalità o disturbi del sonno (Rabinovici, 2019). L'EOAD comprende solo il 4-6% di tutti i casi di Alzheimer ma è stata la prima forma di Alzheimer ad essere mai stata diagnosticata (il primo paziente a cui è stata diagnosticata l'AD, Auguste Deter, aveva 40 anni al momento della diagnosi). L'EOAD si distingue dal LOAD per una maggiore atrofia parietale, differenze nella sostanza bianca e una minore diminuzione di volume dell'ippocampo. L'EOAD è caratterizzato da un ridotto tono cardiovascolare, gravi alterazioni della memoria, diminuite le comorbidità, quali disturbi vascolari o diabete, rispetto al LOAD (Mendez, 2017). Un'altra

variante di AD poco diffusa è la variante di tipo familiare (FAD): definita anche *early-onset familial Alzheimer's disease*, è caratterizzata da mutazioni geniche trasmesse in maniera ereditaria. Se la mutazione è a carico di un gene che codifica per la presenilina 1 o 2 o del gene che codifica la proteina precursore dell'amiloide (APP) la trasmissione è autosomica dominante. Le mutazioni di questi tre geni impattano il corretto funzionamento delle vie del segnale che regolano la degradazione di APP e portano all'eccessiva formazione di  $\beta$ -amiloide. Questa variante dell'AD è diagnosticata solitamente prima dei 65 anni e sintomi possono comparire già dai 30-40 anni d'età in maniera paragonabile a quanto avviene in un paziente con EOAD (Wu et al., 2012).

Marker neuropatologici caratteristici dell'AD sono la presenza di depositi di placche di  $A\beta$  extracellulari e grovigli neurofibrillari caratterizzati dall'accumulo di proteina Tau iperfosforilata. La proteina  $\beta$ -amiloide deriva da un precursore fortemente espresso nel sistema nervoso centrale chiamato *Amyloid Precursor Protein* a seguito di processi di clivaggio in cui intervengono vari enzimi noti con il nome di secretasi. In particolare, esistono due *pathways* attraverso i quali viene processata l'APP: quello amiloidogenico e quello non-amiloidogenico. Il primo deriva dall'azione successiva di  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi che sono in grado di generare un frammento solubile di APP derivato dal taglio al C-terminale, i frammenti di  $A\beta$  possono esistere in 2 isoforme: da 40 ( $A\beta$ 40, isoforma maggiormente generata dai neuroni) e 42 ( $A\beta$ 42) amminoacidi.  $A\beta$ 42 è la isoforma che tende ad aggregarsi e a formare le placche amiloidi extracellulari presenti nell'AD. Esiste poi il *pathway* non-amiloidogenico, in cui APP è tagliata in sequenza da  $\alpha$ - e  $\gamma$ -secretasi generando oltre ad un frammento di APP solubile anche dei frammenti proteici non coinvolti nella formazione di placche. Sono stati individuati due tipi di mutazioni autosomiche dominanti che possono causare una formazione aberrante di  $A\beta$  e un suo accumulo con conseguente formazione di placche amiloidi: mutazioni nell'APP e mutazioni nelle preseniline, in particolare nella PS-1, una delle quattro proteine facenti parte del complesso della  $\gamma$ -secretasi (Walker, 2020).

La proteina Tau è la componente principale dei grovigli neurofibrillari intraneuronali, ammassi insolubili che rappresentano uno dei più importanti marker neuropatologici dell'AD. La proteina Tau è normalmente associata ai microtubuli e regola il trasporto assonale. L'aggregazione di fibrille di proteina Tau è correlata ad una anormale fosforilazione che in alcuni casi può portare a neurotossicità e ad una localizzazione errata della stessa proteina all'interno del compartimento somatodentritico dei neuroni. Inoltre, la

presenza di placche di A $\beta$  sembra accelerare l'aggregazione della proteina Tau e la propagazione di patologie ad essa correlata. Le placche amiloidi sono infatti fortemente correlate ai grovigli neurofibrillari di proteina Tau e i casi in cui si ha presenza di placche di A $\beta$  senza la contemporanea presenza di una patologia Tau-correlata sono molto rari (Thal e Tomé, 2022).

Diverse terapie e nuove strategie sono in sviluppo in questi anni al fine di trovare una cura per l'AD. L'OMS ha rilasciato nel 2019 delle linee guida al fine di prevenire il rischio di declino cognitivo e/o di sviluppare forme di demenza, tra cui l'AD; queste linee guida includono diverse raccomandazioni, sebbene con diversi gradi di affidabilità, riguardo lo svolgere attività fisica e regolare il consumo di alcool e tabacco, approfondiscono inoltre la presenza di condizioni di obesità, ipertensione o diabete come fattori di rischio (Scheltens et al., 2021). Per quanto riguarda una possibile terapia farmacologica invece, la ricerca incontra ancora oggi diversi ostacoli e difficoltà. Gli obiettivi di una terapia farmacologica contro l'AD si focalizzano sul miglioramento delle performance cognitive, la risoluzione dei problemi comportamentali o il ritardare l'esordio della malattia. I farmaci più utilizzati sono potenziatori della funzione colinergica come donepezil, rivastigmina e galantamina, o antagonisti dei recettori NMDA del glutammato come la memantina; nel 2021 sono stati approvati due anticorpi monoclonali anti-A $\beta$ , il Lecanemab e l'Aducanemab. Le terapie esistenti, tuttavia, sono sintomatiche, in quanto nessun farmaco è in grado di far regredire o bloccare l'avanzamento della malattia. Ad oggi oltre 50 composti sono studiati in vari trials clinici allo scopo di trovare un farmaco in grado di migliorare il decorso della malattia o di bloccarne l'avanzamento, tra cui statine, agonisti PPAR $\gamma$  e molecole neurotrofiche. Le principali strategie terapeutiche (**Fig.1**) attuate dall'inizio del XXI secolo e comprendenti la maggior parte dei farmaci attualmente in sviluppo contro l'AD, riguardano:

- Il blocco dell'oligomerizzazione dei peptidi di A $\beta$ , attraverso l'uso di immunoterapici. Può essere effettuata un'immunizzazione attiva o passiva. La prima viene attuata attraverso l'uso di peptidi che hanno come target l'N-terminale del frammento A $\beta$  e che permettono agli anticorpi di legarsi al peptide e mediare una *clearance* di A $\beta$ . Questa strategia assicura una concentrazione di anticorpi sempre elevata ed è meno costosa di un'immunizzazione passiva. L'immunizzazione passiva è effettuata invece attraverso la somministrazione di anticorpi monoclonali e ha lo scopo di bloccare lo sviluppo degli oligomeri A $\beta$  e accelerare

la *clearance* dei frammenti A $\beta$ ; il vantaggio principale dell'immunizzazione passiva risiede in una maggiore facilità degli anticorpi nel legare certi epitopi di A $\beta$ .

- L'inibizione delle  $\beta$ -secretasi e  $\gamma$ -secretasi, attraverso l'utilizzo di agonisti PPAR $\gamma$  o di inibitori specifici della  $\gamma$ -secretasi. I PPAR $\gamma$ -agonisti attivano il recettore nucleare PPAR, che causa un aumento dell'ubiquitinazione di APP e una conseguente inibizione della produzione di  $\beta$ -secretasi. Per quanto riguarda gli inibitori della  $\gamma$ -secretasi diversi farmaci sono arrivati a studi clinici di fase III (Schneider et al., 2005; Aisen et al., 2008; Bhole et al., 2023) ma nessuno è ancora stato approvato.
- La vaccinazione contro A $\beta$ .
- Farmaci in grado di inibire l'aggregazione o la fosforilazione della proteina Tau, come inibitori di chinasi Tau-specifiche, inibitori della fibrillazione o agenti stabilizzanti i microtubuli.
- Farmaci che agiscono sul controllo della quantità di colesterolo, in particolare modulatori della sintesi e secrezione dell'Apolipoproteina E (ApoE). L'espressione dell'isoforma ApoE4 è un importantissimo fattore di rischio genetico per lo sviluppo di Alzheimer.
- Farmaci che agiscono sulla funzione colinergica, similmente ai farmaci già presenti sul mercato (inibitori di acetilcolinesterasi), ma anche composti che aumentano il rilascio vescicolare di acetilcolina e potenziatori diretti della funzione colinergica.

Tuttavia, gli studi clinici per questi composti incontrano molte difficoltà, quali un costo eccessivo, problemi di selettività, la necessità di un periodo prolungato di osservazione dovuto al modo in cui si sviluppa l'AD o l'agire su una parte della cascata patogenica che ha solo minimi effetti sulla malattia (Bhole et al., 2023).

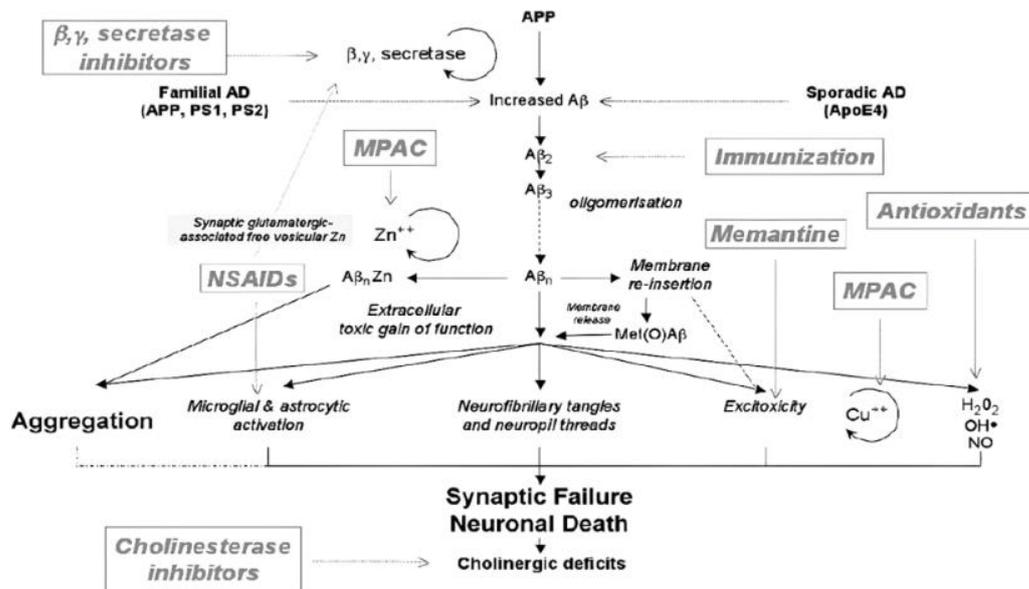


Figura 1. Rappresentazione schematica del ruolo di Aβ nell'AD includendo gli approcci terapeutici oggi in uso o in sviluppo. NSAID = farmaci anti-infiammatori non steroidei, MPAC = *metal protein attenuating compounds* (Bhole et al., 2023).

## 1.2 La neurogenesi adulta

La neurogenesi adulta è una forma di neuroplasticità che porta alla formazione di neuroni nuovi, funzionalmente integrati nei circuiti neuronali preesistenti, a partire da cellule staminali/progenitrici (NPC) indifferenziate e multipotenti. È un processo che, nell'adulto, avviene in specifiche e limitate aree cerebrali, dette "nicchie", come la zona subgranulare (SGZ) del giro dentato (DG) dell'ippocampo e la zona subventricolare (SVZ). Fino agli anni '90 si riteneva che la neurogenesi nei mammiferi fosse attiva solo nell'età prenatale e nelle prime settimane di vita, nonostante già nel 1965 Altman e Das avessero trovato evidenze anatomiche ed istologiche della presenza di neurogenesi in ratti adulti. Con la scoperta della bromodeossiuridina (BrdU, un nucleotide analogo della timidina che viene incorporato nel DNA neosintetizzato) quale marcatore di cellule in attiva proliferazione la ricerca sulla neurogenesi adulta ha compiuto grandi passi in avanti ed è stato possibile dimostrarne la presenza anche nell'uomo, identificando i neuroni neoformati grazie anche all'uso di marcatori neuronali quali calbindina, NeuN o enolasi neurone-specifica (NSE) (Eriksson et al., 1998; Ming e Song, 2011).

Le cellule staminali neurali (NSC) dalle quali originano i nuovi neuroni possiedono differenti capacità: proliferazione, auto-rinnovamento, multipotenzialità. La proliferazione cellulare permette di incrementare il numero totale di cellule ed è attuata tramite la crescita e la

divisione cellulare; è influenzata da diverse caratteristiche del *pool* di staminali iniziali quali la dimensione del *pool* iniziale, il numero totale di divisioni, la frequenza con cui dividono i progenitori e la frazione di cellule proliferative e non-proliferative generate (Homem et al., 2015). Le NSC possono dividersi simmetricamente o asimmetricamente: attraverso la divisione mitotica simmetrica sono capaci di originare due cellule staminali, mentre attraverso la divisione mitotica asimmetrica sono capaci di originare una cellula staminale ed una cellula con capacità proliferativa ridotta destinata al differenziamento chiamata cellula progenitrice. Sono inoltre multipotenti, capaci cioè di differenziare in diversi fenotipi cellulari come neuroni, astrociti ed oligodendrociti.

Le NPCs possono essere classificate in base alla loro localizzazione nel cervello, al profilo di espressione genica o alla loro morfologia (Martínez-Cerdeño e Noctor, 2018), hanno un ciclo cellulare caratterizzato da una importante fase di quiescenza (la maggior parte delle NPCs adulte si trovano in stato di quiescenza per gran parte della loro vita) (Berg et al., 2018). Inoltre, le NPCs mostrano plasticità ridotta, hanno un diverso profilo trascrittomico e la loro localizzazione è ristretta per la maggior parte a poche e specifiche regioni del cervello chiamate nicchie neurogeniche (Morales e Mira, 2019; Makrygianni e Chrousos, 2023).

### 1.2.1 Le nicchie neurogeniche

Le NPCs adulte risiedono principalmente in due regioni del cervello denominate *subgranular zone* (SGZ), nel giro dentato dell'ippocampo, e *sub-ventricular zone* (SVZ), che delimita la parete laterale dei ventricoli laterali e si estende tra il corpo calloso e lo striato (Bordey, 2005). Oltre alla SGZ e la SVZ, negli ultimi anni è stata descritta anche un'altra nicchia neurogenica nella zona ventricolare dell'ipotalamo mediobasale (Xu et al., 2005; Lee et al., 2012; Yoo e Blackshaw, 2018). La nicchia neurogenica descrive il microambiente complesso e dinamico che sostiene ogni aspetto della vita delle NPCs, permette di controllare lo stato di quiescenza o di attivazione delle NPCs e fornisce importanti segnali per guidare un eventuale differenziamento. La nicchia è una struttura composta da NPCs, neuroni maturi, cellule endodimali, periciti, cellule gliali e cellule vascolari (Bjornsson et al., 2015).

L'ippocampo è la regione del cervello più studiata per quanto riguarda la neurogenesi adulta. Anatomicamente l'ippocampo è localizzato internamente nel lobo temporale. È inserito nel sistema limbico e svolge un ruolo di primaria importanza in processi di apprendimento e

memoria ed è inoltre fondamentale per la navigazione spaziale, il comportamento emozionale e la regolazione di funzioni ipotalamiche. È composto da due parti, l'ippocampo proprio e il giro dentato. L'ippocampo proprio è diviso in quattro zone: CA1, CA2, CA3, CA4 (Anand e Dhikav, 2012). Durante la neurogenesi adulta ippocampale, dal DG vengono originate le cellule granulari eccitatorie, le quali proiettano ai neuroni piramidali nella CA3 i cui assoni proiettano alla CA1 spesso passando attraverso la CA2. I precursori di queste cellule risiedono nella SGZ compresa tra strato delle cellule granulari (GCL) e ilo.

La neurogenesi ippocampale adulta (*adult hippocampal neurogenesis*, AHN) può essere suddivisa in quattro fasi: una fase dei precursori cellulari, una fase di espansione, una fase di maturazione post-mitotica e una fase di sopravvivenza tardiva (Steiner et al., 2006). I precursori neuronali da cui ha inizio l'AHN sono le *radial glial-like cells* (RGL), cellule che hanno il corpo nella SGZ con processi che si estendono nello strato molecolare e ricevono stimoli quali fattori umorali a lungo e corto raggio e contatti cellula-cellula, che ne permettono lo sviluppo in un ambiente controllato. Partendo dalle RGL si arriva alla fase dei precursori cellulari attraverso tre stadi di maturazione associati ad una fase altamente proliferativa; si giunge successivamente ad una fase post-mitotica in cui le cellule escono dal ciclo cellulare e completano la maturazione. Entro sette settimane dalla nascita vengono completate le connessioni glutamatergiche, rendendo i nuovi neuroni elettrofisiologicamente indistinguibili dalle cellule granulari già presenti. Infine, i nuovi neuroni entrano in una fase di aumentata plasticità sinaptica iniziando il potenziamento a lungo termine (LTP) (Kempermann et al., 2015). I nuovi neuroni saranno fondamentali nello sviluppo cognitivo ippocampo-dipendente e in funzioni quali memoria spaziale, riconoscimento di pattern, mantenimento della memoria sociale e regolazione dei network eccitatori ed inibitori (**Fig.2**).

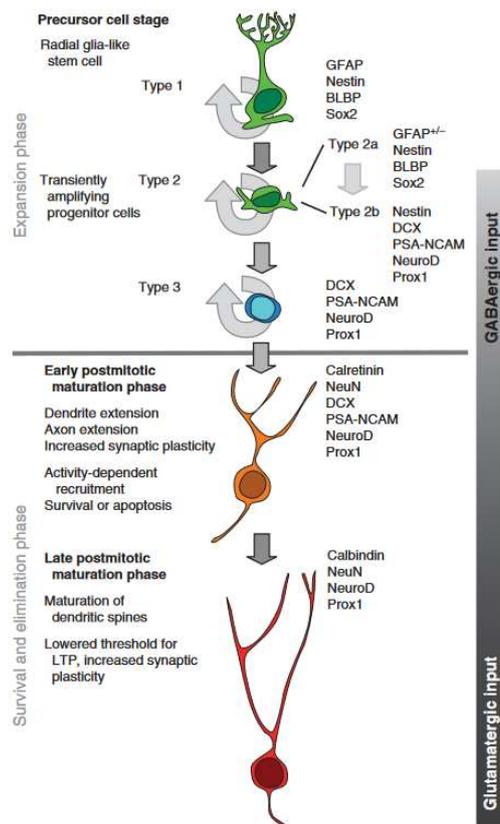


Figura 2. Fasi della neurogenesi adulta nell'ippocampo con marcatori associati (Kempermann et al., 2015).

Anche gli astrociti presenti nella nicchia neurogenica giocano un ruolo fondamentale nell'AHN, trovandosi in una stretta relazione spaziale con le cellule del GCL. La SGZ inoltre riceve input da varie regioni del cervello: serotoninergici dai nuclei del rafe rostrale, dopaminergici dai neuroni dell'area tegmentale ventrale (VTA), colinergici dalla regione mediale del setto e GABAergici da interneuroni locali; questi ultimi risultano fondamentali per lo sviluppo neuronale (Marin-Burgin et al., 2012). Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale, è fondamentale sia nella fase di sopravvivenza precoce dei precursori neuronali che in quella post-mitotica: nella prima il GABA è il neurotrasmettitore principale a cui rispondono le cellule uscite dal ciclo cellulare e, legandosi al suo recettore-canale GABA A, è in grado di modulare sia la trasmissione eccitatoria che quella inibitoria (Ge et al., 2006); nella fase post-mitotica il GABA è necessario per permettere ai neuroni di formare sinapsi eccitatorie di tipo glutamatergico (Kempermann et al., 2015).

Diversi fattori trascrizionali sono in grado di agire sulle NPCs adulte al fine di regolare la quantità delle cellule quiescenti, il numero di nuovi neuroni o astrociti che si formeranno e

la transizione da un fenotipo all'altro (Ming e Song, 2011). Un fattore fondamentale nel mantenimento delle NPCs adulte è Sox2: la proteina codificata da questo gene è importante nel mantenimento dell'equilibrio fra differenziamento e proliferazione (Steiner et al., 2006, Kempermann et al., 2015). Altra importante proteina per il controllo della neurogenesi adulta è la nestina, una proteina dei filamenti intermedi di tipo IV che è in grado di influenzare l'auto-rinnovamento, la migrazione e il differenziamento delle NPCs. Altri fattori quali Wnt3 (Lie et al., 2005), Tlx o Ascl1 (Shi et al., 2004; Kempermann et al., 2015) sono in grado di controllare il differenziamento delle NPCs ad un fenotipo neuronale. Al contrario proteine come le *Bone morphogenic proteins* (BMP) possono promuovere un differenziamento di tipo gliale ed inibire il differenziamento neuronale nel cervello adulto (Li et al., 2009).

### 1.2.2 La neurogenesi adulta nell'ipotalamo

Come descritto in precedenza, negli ultimi anni è stata descritta una nicchia neurogenica nella zona ventricolare dell'ipotalamo mediobasale (Xu et al., 2005; Lee et al., 2012; Yoo e Blackshaw, 2018). L'ipotalamo è una regione bilaterale del cervello facente parte del diencefalo, una struttura mediana situata nell'encefalo. È localizzato inferiormente al talamo e ai lati del terzo ventricolo, di cui continua in parte il pavimento. È connesso al tronco encefalico, alla corteccia cerebrale, all'ippocampo, all'amigdala e al talamo. Ha contatti anatomici e funzionali con l'ipofisi, partecipando alla regolazione neuroendocrina attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi. L'ipotalamo è una regione in grado di integrare segnali provenienti dall'ambiente ed è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo. Fra le numerose funzioni regolate dai nuclei ipotalamici vi sono l'appetito, il metabolismo energetico, l'equilibrio idro-salino, la termoregolazione, la crescita, l'invecchiamento, il ciclo sonno-veglia, la risposta neuroendocrina allo stress e l'espressione degli stati emotivi (Makrygianni e Chrousos, 2023).

È stato visto che in modelli murini, l'ipotalamo è anche in grado di regolare la neurogenesi adulta nella SVZ e nel DG dell'ippocampo: i neuroni pro-opiomelanocortinici del nucleo arcuato (POMC<sup>ARC</sup>) inviano lunghe proiezioni alla SVZ. Segnali di fame o sazietà regolano la proliferazione di una sottopopolazione di NPCs presenti nella SVZ attraverso la modulazione dell'attività dei neuroni POMC<sup>ARC</sup>: il digiuno diminuisce la proliferazione delle NPCs mentre la ripresa dell'alimentazione ripristina il numero di NPCs ai livelli basali (Paul et al., 2017). Sempre in modelli murini è stato visto che i neuroni dei nuclei sopramammillari, attivati da stimoli ambientali, proiettano i loro assoni al DG

dell'ippocampo; questi sono neuroni sia glutamatergici che GABAergici ed una loro attivazione cronica promuove la maturazione delle NPCs ippocampali a nuovi neuroni.

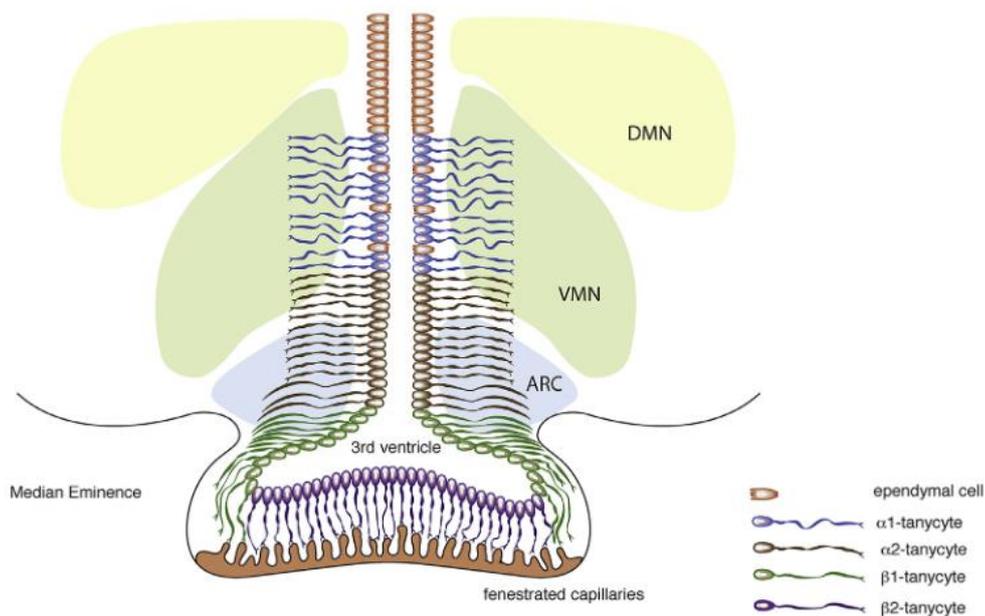
La neurogenesi adulta ipotalamica è un argomento relativamente poco approfondito nella letteratura scientifica rispetto alle due principali regioni in cui avviene la neurogenesi adulta, la SVZ e la SGZ. Nell'ipotalamo sono presenti diverse componenti comuni ad una nicchia neurogenica, quali la presenza di un pool di staminali/progenitori neurali e un microambiente comprensivo di vasi, fattori solubili, sostanze morfogeniche e molecole di signaling atte a contribuire alla regolazione della proliferazione o al mantenimento del pool di staminali. I primi studi in vitro su colture cellulari ipotalamiche di ratti adulti hanno dimostrato che esistono cellule nell'ipotalamo adulto in grado di generare neuroni, inoltre colture cellulari ipotalamiche di ratti di 15 settimane contengono neuroni immaturi e cellule staminali (Evans et al., 2002). Altri studi hanno dimostrato che la stimolazione tramite infusione di fattori di crescita è in grado di indurre la proliferazione delle NPCs ipotalamiche.

È stato tuttavia notato che la neurogenesi ipotalamica differisce rispetto alla neurogenesi nella SVZ o nella SGZ, in quanto il tasso di neurogenesi è probabilmente inferiore rispetto alle due nicchie principali (Bartkowska et al., 2023).

È stato ipotizzato che le cellule con proprietà glio- e neurogeniche nell'ipotalamo appartengano a una popolazione di *radial glial-like cells* specializzate chiamate taniciti. I taniciti hanno i corpi cellulari localizzati alla base del terzo ventricolo (**Fig. 3**); sono cellule che generalmente inviano una o due ciglia apicali all'interno del ventricolo e proiettano un lungo singolo processo basale nel parenchima ipotalamico o ventralmente verso i capillari dell'eminenza mediana (Bolborea e Dale, 2013). Queste loro caratteristiche rendono possibile l'accesso diretto a segnali trasmessi dal circolo sanguigno, oltre a mettere i taniciti a diretto contatto con il liquido cefalorachidiano, caratteristica unica rispetto alle altre popolazioni di NSC conosciute. I taniciti sono cellule in grado di dividersi (Xu et al., 2005) e possiedono diversi sistemi di segnale associati alle cellule staminali come la presenza di recettori P2Y1, la possibilità di rilasciare ATP e l'espressione di NTPDasi2. È stato inoltre dimostrato, sia nell'uomo che in modelli animali, che i taniciti esprimono marcatori associati quali DCX, GFAP, nestina e vimentina (Wei et al., 2002; Bolborea e Dale, 2013). Inoltre, alcuni sottotipi di taniciti esprimono anche Sox2 e proteine associate alla proliferazione cellulare come Ki67. Inoltre, Xu et al. (2005) hanno dimostrato che, in vitro, i taniciti sono

in grado di formare neurosfere dotate di capacità di differenziamento in sottotipi cellulari gliali e neuronali.

Recentemente Son et al., (2021) hanno individuato in topi adulti un sottotipo di RGL diverso dai taniciti sul pavimento e le pareti dorsali del terzo ventricolo; queste RGL sono intercalate fra i taniciti  $\alpha$  e  $\beta$  ed esprimono in grande quantità le proteine IRX3 ed IRX5 (fondamentali nello sviluppo neurale embrionale) che, se downregolate, possono causare un aumento del numero dei neuroni nel nucleo arcuato e un'aumentata sensibilità dell'ipotalamo alla leptina. Queste RGL si comportano come NPCs, differenziando a neuroni e taniciti, esprimono Sox2, marcatori legati allo stato di quiescenza e hanno debole espressione di GFAP.



*Figura 3* Distribuzione dei taniciti lungo la parete del terzo ventricolo. ARC = nucleo arcuato, VMN = nucleo ventromediale, DMN = nucleo dorsomediale (Rizzoti e Lovell-Badge, 2016).

Diversi studi hanno indagato il ruolo funzionale della neurogenesi ipotalamica; inizialmente ci si è concentrati sul suo ruolo nel regolare il metabolismo e il peso corporeo, questo perché l'ipotalamo medio-basale (in cui sono inseriti, tra gli altri, i nuclei arcuato e ventromediale e l'eminenza mediana, regioni a diretto contatto con lo strato tanicitico e dove i nuovi neuroni ipotalamici si integrano) è un importante regolatore del metabolismo e i nuclei presenti in questa regione rispondono direttamente a stimoli che regolano l'appetito. In particolare, in uno studio di Kokoeva et al. (2005) è stata stimolata la neurogenesi in questa regione in topi adulti tramite infusione (una settimana) di *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), un

trattamento che porta a perdita di peso a lungo termine. Il trattamento ha dato origine a neuroni che esprimevano marcatori tipici di neuroni orexinergici e anorexinergici quali POMC e NPY; un successivo arresto della neurogenesi tramite iniezione di citarabina ha completamente annullato l'effetto sulla perdita di peso dato dal CNTF suggerendo un ruolo attivo del processo di neurogenesi in questa regione nella regolazione del peso corporeo (Kokoeva et al., 2005; Yoo e Blackshaw, 2018). Altri studi (Li et al., 2014; Makrygianni e Chrousos, 2023) hanno dimostrato che l'ablazione di NPCs nell'ipotalamo medio-basale di topi adulti causa aumento dell'appetito, aumento di peso e intolleranza al glucosio. In maniera simile, la esposizione a lungo termine ad una dieta ad alto contenuto lipidico (high-fat diet, HFD) induce infiammazione dell'ipotalamo mediobasale, diminuzione di sopravvivenza, proliferazione e differenziamento delle NPCs, riduce il numero di neuroni POMC<sup>ARC</sup> e, dopo alcuni mesi, obesità, intolleranza al glucosio e iperinsulinemia (Li et al., 2012). Importante è anche il ruolo della neurogenesi ipotalamica sul ciclo sonno-veglia: uno studio su topi giovani ha infatti dimostrato come la sua soppressione tramite infusione di un agente antimitotico per 4 settimane abbia drasticamente diminuito il numero di cellule BrdU positive (-96%) nel terzo ventricolo, alterando il ciclo sonno-veglia degli animali con variazioni nel sonno nonREM e REM fenotipicamente compatibili con i pattern di sonno di topi anziani (Kostin et al., 2019; Makrygianni e Chrousos, 2023). Ancora, studi sperimentali suggeriscono che la neurogenesi ipotalamica possa essere coinvolta nei processi di invecchiamento; l'ablazione selettiva delle cellule Sox2<sup>+</sup>/BMI1<sup>+</sup> (BMI-1 è una proteina del gruppo Polycomb essenziale per il mantenimento e il *self-renewal* delle NSC nell'adulto) in topi adulti di 11-15 mesi ha causato una significativa diminuzione della durata della vita di questi animali rispetto agli animali di controllo (Zhang et al., 2017, Makrygianni e Chrousos, 2023).

La nicchia neurogenica ipotalamica è regolata da meccanismi intrinseci ed estrinseci. Diversamente dalle nicchie neurogeniche più estensivamente studiate, nell'ipotalamo alcuni fattori molecolari, alcune vie di segnale e fattori trascrizionali devono ancora essere definiti e approfonditi; tuttavia, negli ultimi anni sono stati scoperti diversi meccanismi in grado di regolare la neurogenesi in questa regione.

Sox2, fattore di trascrizione legato alla staminalità ed espresso dai taniciti, interagisce con il cofattore OCT4 mediando il reclutamento di fattori nucleari che attivano l'espressione di geni relativi alla pluripotenza e silenziando geni coinvolti nel differenziamento. Sox2 è

anche in grado di regolare l'espressione del fattore di crescita basico dei fibroblasti (FGF-2) e nestina (Zhang e Cui, 2014). Quest'ultima è in grado di influenzare l'auto-rinnovamento, la migrazione e il differenziamento delle NPCs. Inoltre, la proliferazione dei taniciti è sotto il controllo di vie di segnale extracellulari. In particolare, nel cervello adulto il numero di taniciti sembra essere controllato da Wnt3 che promuove la proliferazione delle NPCs adulte (Ming e Song, 2011).

Nella regolazione della neurogenesi ipotalamica va considerata anche l'azione della noradrenalina che ha azione negativa, mentre è un regolatore positivo della neurogenesi ippocampale. Uno studio ha infatti dimostrato che la noradrenalina è in grado di sopprimere la proliferazione delle NPCs ipotalamiche promuovendo la loro uscita dal ciclo cellulare attraverso l'attivazione di recettori  $\beta$ -adrenergici (Weselek et al., 2020). Altri lavori hanno analizzato l'effetto di meccanismi di tipo endocrino. È stato osservato come ormoni gonadici controllino lo sviluppo di sottotipi neuronali nell'ipotalamo di topi nella pubertà, con differenze fra maschi e femmine. Nello specifico nelle femmine è stata osservata neurogenesi nei nuclei anteroventrali paraventricolari mentre nei maschi è stata osservata nell'area preottica. Tuttavia, gonadectomia ha annullato tutte le differenze sulla neurogenesi date dal sesso dei topi (Ahmed et al., 2008, Yoo e Blackshaw, 2018). Fra i meccanismi estrinseci che possono influenzare la neurogenesi ipotalamica, l'effetto dell'HFD a breve e lungo termine è il più estensivamente studiato. Il nucleo arcuato ipotalamico è un importante centro di regolazione dell'equilibrio energetico e dell'appetito ed è una regione soggetta a un rimodellamento neuronale continuo; uno studio in cui topi di 16 settimane sono stati trattati con HFD per 4 settimane ha dimostrato una riduzione nel numero di nuovi neuroni integrati nel nucleo arcuato e una minore sopravvivenza sia dei neuroni nati in età adulta che durante lo sviluppo (McNay et al., 2012). In un altro studio, è stato dimostrato che la somministrazione di estradiolo a topi femmina è in grado di contrastare parzialmente la riduzione della neurogenesi causata da HFD (Bless et al., 2016). Il trattamento a lungo termine con HFD può inoltre indurre infiammazione a causa dell'attivazione della via IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B nell'ipotalamo medio-basale, bloccando sia la proliferazione che la sopravvivenza delle NPCs ipotalamiche, upregolando geni pro-apoptotici (Li et al., 2012).

### 1.3 La neurogenesi adulta nella malattia di Alzheimer

Nel corso dell'ultima decade è emerso che un'alterata neurogenesi nel DG dell'ippocampo possa causare un incremento della vulnerabilità di questa regione nell'AD ed esacerbare i deficit cognitivi in stadi avanzati della malattia (Mu e Gage, 2011).

Un iniziale studio *post mortem* su tessuti di ippocampo da pazienti con AD ha suggerito un'aumentata neurogenesi (Jin et al., 2004). Altri studi più recenti *post mortem* su tessuti ippocampali prelevati da pazienti con AD (Tobin et al., 2019; Moreno-Jiménez et al., 2019) hanno chiaramente mostrato invece una riduzione della neurogenesi adulta nell'AD, in particolare un ridotto numero di neuroni immaturi. Attualmente si ipotizza che una disregolazione della neurogenesi adulta ippocampale possa contribuire all'insorgere di deficit cognitivi, nonostante i meccanismi della disregolazione della neurogenesi nell'AD non siano ancora stati completamente definiti (Sung et al., 2020).

Diversi modelli di animali transgenici sono stati utilizzati al fine di studiare la neurogenesi adulta nell'AD: mutazioni singole, doppie o triple su APP (la proteina da cui hanno origine i frammenti A $\beta$ ), mutazioni sulle preseniline (proteine facenti parte del complesso della  $\gamma$ -secretasi), mutazioni sul gene codificante l'apolipoproteina E (una proteina coinvolta nel trasporto dei trigliceridi, la presenza dell'allele E4 induce l'accumulo di colesterolo in cellule astrocitarie) e mutazioni sulla proteina Tau (la componente principale dei grovigli neurofibrillari intraneuronali). Tutti i modelli murini AD nelle diverse condizioni hanno mostrato una neurogenesi alterata in fase precoce. Molecole importanti nella patogenesi dell'AD hanno un ruolo nella regolazione della neurogenesi adulta. Per esempio, alcuni metaboliti di APP, tra cui l'*amyloid precursor protein intracellular domain* (AICD) e i precursori solubili  $\alpha$  e  $\beta$  (sAPP- $\alpha$ , sAPP- $\beta$ ) sono in grado di modulare varie funzioni delle NSC, tra cui neurogenesi, gliogenesi, morte cellulare e proliferazione. In particolare, uno studio su topi transgenici modello di AD ha mostrato come l'espressione di AICD abbia diminuito la sopravvivenza e la proliferazione di NPCs ippocampali; al contrario, sAPP- $\alpha$  ha avuto un effetto protettivo sui neuroni e ha promosso la neurogenesi (Ghosal et al., 2010; Mu e Gage, 2011). Altri studi hanno estensivamente analizzato l'azione delle proteine della famiglia delle disintegrin-metalloproteinasi (ADAM). Questa famiglia di proteine è nota per avere azione  $\alpha$ -secretasica *in vivo*. Diversi membri della famiglia ADAM sono coinvolti anche nella neurogenesi adulta, in particolare nella proliferazione, nel differenziamento e nella migrazione delle NPCs sia nella SGZ che nella SVZ (McMillan et al., 2022).

Mutazioni della presenilina 1 (PS-1), possono avere effetti negativi nella formazione dei nuovi neuroni. In uno studio su modello animale, la downregolazione di PS-1 in NPC's ippocampali ha causato alterazioni nella formazione dell'albero dendritico (diminuzione nel numero di intersezioni e del numero di spine dendritiche) e l'insorgenza di deficit cognitivi (Bonds et al., 2015; Sung et al., 2020). In un altro studio, topi transgenici che esprimono un gene mutato per PS-1 hanno mostrato diminuita sopravvivenza delle NPC's con un minor numero di nuovi neuroni rispetto agli animali di controllo (Wen et al., 2004; Mu e Gage, 2011). Anche topi knock-in per gli alleli ApoE4 umana o topi knock-out per ApoE hanno mostrato un'alterata neurogenesi ippocampale. In topi ApoE4-knock-out è stato osservato un aumento del differenziamento di tipo gliale a discapito di quello neuronale, mentre nei topi knock-in è stata rilevata una sopravvivenza diminuita degli interneuroni GABAergici nell'ippocampo, che correla con una diminuzione della maturazione neuronale nel DG a causa della mancanza degli input GABAergici. Tuttavia, nel modello ApoE4-knock-in gli effetti di ApoE4 sono stati revertiti potenziando la trasmissione GABAergica, suggerendo quindi che il signaling del GABA possa rappresentare un importante target per mitigare gli effetti di ApoE4 sulla neurogenesi (Li et al., 2009). Gli effetti sulla neurogenesi in modelli murini di AD con due o tre mutazioni associate alla malattia sono ancora più esacerbati. Per esempio, in topi doppi transgenici APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 (che portano la mutazione Svedese per il gene che codifica APP e la variante con delezione dell'esone 9 nel gene che codifica PS-1) la sopravvivenza a lungo termine dei nuovi neuroni è drasticamente diminuita rispetto al controllo *wild-type* (WT), con una riduzione significativa nella proliferazione e nel differenziamento delle NPC's che precede la formazione di placche amiloidi (Verret et al., 2007; Mu e Gage, 2011).

È ancora incerto se le alterazioni precoci della neurogenesi adulta possano rappresentare il target per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per rallentare la progressione dell'AD. Su questi punti la ricerca è particolarmente attiva e diversi studi sono stati pubblicati negli ultimi anni volti ad indagare la relazione fra AD e neurogenesi adulta.

Al fine di studiare la relazione tra neurogenesi adulta e AD, Choi et al. (2018) hanno ridotto la neurogenesi adulta tramite iniezione di temozolomide in un modello murino 5xFAD (un modello doppio transgenico, presenta cinque mutazioni, tre su APP e due su PS-1, correlate allo sviluppo di Alzheimer di tipo familiare) in topi maschi di 6-8 settimane mostrando che la riduzione della neurogenesi adulta in topi giovani non ha influenzato l'accumulo di A $\beta$ ,

ma ha peggiorato i deficit cognitivi e accelerato la morte neuronale nei topi a 5 mesi di età rispetto ai controlli WT. Negli stessi animali è stata anche aumentata la neurogenesi e la sopravvivenza delle NPCs attraverso un trattamento farmacologico (iniezioni di P7C3 nei topi 5xFAD a partire dai 2 mesi di età, per 4 o 4.5 mesi) senza significativi effetti nel recupero cognitivo. Tuttavia, combinando il trattamento precedente con un aumento dei livelli di *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) sono stati osservati significativi aumenti delle capacità cognitive. Un recente studio di Mishra et al. (2022) ha mostrato che l'aumento della neurogenesi in modelli AD è in grado di ripristinare parzialmente il deficit di memoria; in topi femmina 5xFAD dell'età di un mese è stata indotta una delezione del gene che trascrive la proteina Bax (una proteina coinvolta nell'apoptosi la cui delezione causa un aumento della neurogenesi adulta nell'ippocampo) grazie all'uso di un sistema Nestina-CreER<sup>T2</sup>; Bax<sup>fl/fl</sup>. Dopo 3.5 mesi nei topi con delezione di Bax è stata osservata un'aumentata sopravvivenza delle NPCs e un numero maggiore di neuroni immaturi nel DG accompagnati da performance migliori in test di memoria rispetto agli animali di controllo.

Infine, l'arricchimento ambientale, un altro modulatore positivo della neurogenesi adulta, si è dimostrato efficace in modelli AD APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 e APP23. Topi esposti ad arricchimento ambientale per 3 ore al giorno per un periodo di 1 o 2 mesi hanno mostrato riduzione nei depositi di A $\beta$ . Il trattamento è stato in grado di revertire le disfunzioni cognitive e la riduzione della neurogenesi ippocampale (Hu et al., 2010; Sung et al., 2020).

## 1.4 Il processo di degradazione di APP

Come già precedentemente accennato APP è una proteina di membrana ubiquitariamente espressa nell'organismo e presente ad elevate concentrazioni nel cervello. Dal suo processo di degradazione derivano i peptidi di A $\beta$  che, se accumulati, possono formare aggregati potenzialmente tossici a livello extra- ed intracellulare, determinando morte neuronale. APP è una proteina sintetizzata nel reticolo endoplasmatico e trasportata al sistema del trans-Golgi-network (Zhang et al., 2011). APP può essere trasportata, attraverso meccanismi vescicolari clatrina-mediati, direttamente in membrana oppure ad un compartimento endosomiale. Può essere successivamente processata da 3 proteasi che prendono il nome di  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretasi, che degradano APP in modo diverso (Haass, 2004). Esistono due *pathway* di degradazione di APP: quello amiloidogenico che avviene negli endosomi e quello non-amiloidogenico che avviene direttamente sulla membrana cellulare (**Fig. 4**) (O'Brien e Wong, 2011). Nel *pathway* amiloidogenico che porta alla formazione di A $\beta$ ,

agiscono consecutivamente su APP la  $\beta$ -secretasi (BACE-1, un'aspartil-proteasi transmembrana) e la  $\gamma$ -secretasi; il primo step consiste in un taglio sulla porzione extracellulare di APP da parte di BACE-1 in una posizione che varia da +1 a +11 sul sito A $\beta$ . Questo taglio dell'ectodominio di APP genera un grosso frammento solubile (sAPP- $\beta$ ) ed espone un frammento al C-terminale di APP ( $\beta$ CTF) che verrà successivamente tagliato dall'azione del complesso della  $\gamma$ -secretasi, generando i peptidi A $\beta$  tra cui i più comuni sono A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42. I peptidi A $\beta$  sono rilasciati nell'ambiente extracellulare e sono rintracciabili in fluidi extracellulari come il plasma o il liquido cefalorachidiano (Haass, 2004; Haass et al., 2012; O'Brien e Wong, 2011). Il taglio della  $\gamma$ -secretasi permette anche il rilascio del frammento citoplasmatico AICD. Il *pathway* non-amiloidogenico invece, non porta alla formazione di peptidi A $\beta$ . Questa via prevede l'azione consecutiva dell' $\alpha$ -secretasi (ADAM10, una "shedde" inserita in membrana) e del complesso della  $\gamma$ -secretasi. ADAM10 taglia al centro della regione A $\beta$  (in posizione +17), generando il frammento solubile sAPP- $\alpha$  ed esponendo un frammento al C-terminale di APP troncato rispetto al taglio di BACE-1 ( $\alpha$ CTF). Tale frammento non contiene la regione N-terminale del dominio A $\beta$  (poiché è rimasta legata a sAPP- $\alpha$ ) e dunque non può generare peptidi A $\beta$ . Il frammento al C-terminale viene rimosso dal complesso della  $\gamma$ -secretasi generando un peptide (p3) e il frammento citoplasmatico AICD (Haass et al., 2012; O'Brien e Wong, 2011). Il frammento sAPP- $\alpha$  rilasciato dopo il taglio di APP è molto importante poiché è stato osservato un suo ruolo protettivo per l'integrità strutturale dei neuroni, nonché sulle funzioni di memoria e apprendimento; questo tipo di protezione sembra essere legata a processi trascrizionali, ad una stabilizzazione dell'omeostasi del calcio e ad effetti su alcune vie del segnale implicate nella sopravvivenza cellulare tra cui PI3K/Akt. È stato ipotizzato che bassi livelli di sAPP- $\alpha$  in età avanzata possano contribuire al declino cognitivo in AD (Kogel et al., 2012; Hick et al., 2015; Endres e Deller, 2017).

Fin dall'identificazione del *pathway* non-amiloidogenico si è studiata approfonditamente l'azione e la regolazione dell' $\alpha$ -secretasi, individuando come principale proteina ad attività  $\alpha$ -secretasica ADAM10. Postina et al. (2004) hanno dimostrato che potenziare l'attività dell' $\alpha$ -secretasi in colture cellulari e modelli murini di AD è in grado di diminuire in maniera significativa l'accumulo di A $\beta$  e la formazione di placche amiloidi nell'ippocampo, dimostrando che i *pathway* amiloidogenico e non-amiloidogenico sono in competizione fra loro.

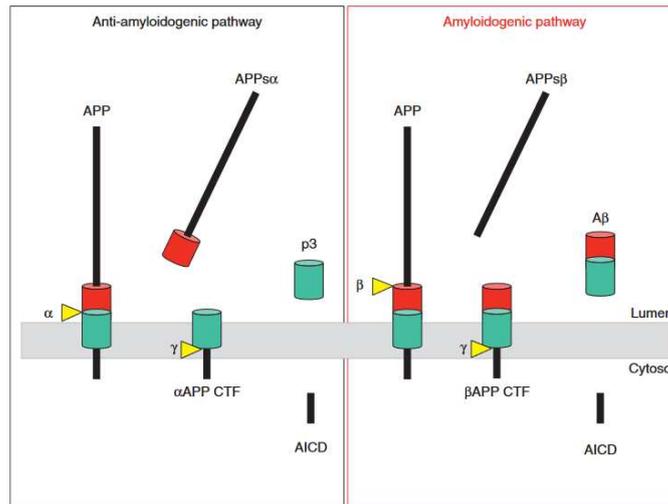


Figura 4. Processamento proteolitico di APP attraverso il *pathway* non-amiloidogenico e amiloidogenico. APP = Amyloid precursor protein, APPs $\alpha$  = soluble amyloid precursor protein  $\alpha$ ,  $\alpha$ APP CTF =  $\alpha$ APP carboxy-terminal fragment, AICD = Amyloid intracellular domain (Haass et al., 2012).

#### 1.4.1 L'aumentata regolazione di ADAM10 nella malattia di Alzheimer

ADAM10 è una proteina di membrana della famiglia ADAM, metalloproteasi zinco-dipendenti con attività disintegrinica. ADAM10 è la proteina principale che svolge il ruolo di  $\alpha$ -secretasi nei neuroni, tagliando il dominio C-terminale di APP e innescando il *pathway* non-amiloidogenico (Kuhn et al., 2010). L'upregolazione o la downregolazione di questa proteina in membrana può avere importanti effetti sulla formazione e l'accumulo di A $\beta$  e sulla successiva generazione di placche amiloidi. Diversi studi hanno dimostrato il ruolo neuroprotettivo di ADAM10: in un modello murino APP/PS1 un'overespressione della proteasi ha ridotto l'accumulo di A $\beta$  e la formazione di placche amiloidi, oltre a migliorare la memoria e l'apprendimento; nello stesso studio, l'overespressione di una variante di ADAM10 cataliticamente inattiva nello stesso modello ha causato gravi peggioramenti dei deficit cognitivi (Postina et al., 2004). Un altro studio in un modello APP/PS1 ha dato lo stesso tipo di risultati, rilevando anche un crollo generale dell'attività  $\alpha$ -secretasica nel modello esprimente la variante inattiva di ADAM10 (Schmitt et al., 2006; Endres e Deller, 2017).

Un altro gruppo di ricerca ha proposto che la modulazione farmacologica dell'attività e della localizzazione in membrana di ADAM10 possa rivelarsi un approccio terapeutico utile in AD. È stato osservato che l'endocitosi di ADAM10 avviene ad opera delle proteine SAP97

e dell'eterotetramero AP-2 in maniera clatrina-dipendente; in particolare, il traffico locale di ADAM10 dal Golgi alla densità post-sinaptica è mediato da SAP97 mentre l'associazione diretta con AP-2 attiva la rimozione di ADAM10 dalla membrana sinaptica; inoltre il meccanismo di rimozione di ADAM10 dalla membrana è significativamente aumentato nell'ippocampo di pazienti AD (Musardo et al., 2022). È stato sviluppato un peptide in grado di permeare le cellule (PEP3) capace di interferire con i meccanismi di endocitosi di ADAM10. La struttura di PEP3 è stata disegnata in modo da competere con ADAM10 per il legame ad AP-2 e interferire con la endocitosi di ADAM10, con conseguente aumento della disponibilità sinaptica della proteasi nell'ippocampo. La somministrazione intraperitoneale subcronica (due settimane) di PEP3 in un modello murino APP/PS1 dell'età di 12 mesi ha mostrato una significativa inibizione dell'interazione fra ADAM10 e AP-2 e un conseguente aumento della disponibilità di ADAM10 a livello post-sinaptico. Tuttavia, gli animali non hanno mostrato miglioramenti dei deficit cognitivi. L'esperimento è stato ripetuto su topi APP/PS1 ad uno stadio precoce della patologia, ovvero a 6 mesi. È stato confermato che la somministrazione intraperitoneale subcronica di PEP3 è in grado di inibire l'endocitosi di ADAM10 causando un'upregolazione a livello post-sinaptico. Inoltre, contrariamente ai topi dell'età di 12 mesi, i topi di 6 mesi hanno mostrato un miglioramento nei test di memoria. Questa strategia terapeutica innovativa può rivelarsi efficace negli stadi precoci della malattia nonostante siano necessari maggiori approfondimenti in tal senso (Musardo et al., 2022).

## 1.5 Il modello murino APP/PS1 per lo studio della malattia di Alzheimer

Nel nostro lavoro di tesi abbiamo lavorato su un modello murino Alzheimer APP/PS1. Questo modello doppio transgenico è il più diffuso fra i modelli che permettono lo sviluppo di AD e deposizione di placche amiloidi. I topi APP/PS1 esprimono una APP chimerica topo/umano che porta la mutazione svedese (Mo/HuAPP695swe) e una presenilina 1 mutante umana (PS1dE9). Entrambe le mutazioni sono associate ad un esordio precoce di AD e questo modello è estensivamente usato per studiare l'AD e altri disordini neurologici associati all'invecchiamento. L'espressione dell'APP chimerica è 3 volte più elevata in questi animali rispetto ad APP endogena. In questi animali è stata osservata una formazione più elevata del frammento A $\beta$ 42 rispetto al frammento A $\beta$ 40. Diversi studi hanno rilevato che i depositi di placche amiloidi sono riscontrabili dalla sesta settimana di vita dell'animale

nella neocorteccia, dai 3 ai 4 mesi nell'ippocampo e dai 4 a 5 mesi in altre regioni quali talamo, ipotalamo e striato (Jankowsky et al., 2004; Radde et al., 2006). Topi APP/PS1 hanno mostrato deficit cognitivi (apprendimento e *reversal learning*) in vari test a partire dai 6-8 mesi di età (Radde et al., 2006).

## 1.6 Proteine rilevanti coinvolte nella Malattia di Alzheimer e/o nella regolazione della neurogenesi

In questo progetto di tesi è stata analizzata l'espressione genica di diversi trascritti nel modello murino APP/PS1 e nella controparte WT. Oltre ad ADAM10, già ampiamente citato e la cui importanza nella protezione del SNC dalla formazione e accumulo di A $\beta$  è già stata evidenziata, sono stati presi in considerazione altri marcatori relativi alla regolazione della neurogenesi o coinvolti nell'AD.

### 1.6.1 AP-2

Il complesso multimerico AP-2 è un complesso proteico coinvolto nella mediazione di processi di endocitosi clatrina-dipendenti. AP-2 è un eterotetramero composto da due grosse subunità  $\alpha$  e  $\beta$  e due subunità più piccole  $\mu$  e  $\sigma$ . Nel sistema nervoso centrale è importante per la plasticità sinaptica e la neurotrasmissione. Il complesso è implicato anche nell'AD, infatti è stato osservato che in topi adulti AP-2 si lega direttamente ad ADAM-10 per mediarne l'endocitosi clatrina-mediata, riducendo la presenza di ADAM10 in membrana e riducendo l'effetto di questa proteina nel limitare la formazione di A $\beta$  (Musardo et al., 2022). Inoltre, un altro studio teorizza l'implicazione di AP-2 nella clearance autofagica dei peptidi A $\beta$  tramite la degradazione del frammento C-terminale dell'APP (Tian et al., 2013).

### 1.6.2 EGFR

Il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) è un recettore tirosin-chinasico diffuso in tutto l'organismo che, se attivato, può stimolare la crescita e la proliferazione cellulare. EGFR ha un ruolo importante nella neurogenesi adulta in quanto la sua attivazione può promuovere sopravvivenza e proliferazione delle NPCs; NPCs stimulate con *epidermal growth factor* (EGF) ed FGF-2 mostrano un forte aumento della proliferazione e *in vitro* sono in grado di formare neurosfere (Romano e Bucci, 2020). Il knock-out di EGFR in cellule isolate dalla SVZ di topi adulti causa un'alterazione nella capacità delle NPCs di differenziare, inducendo le cellule EGFR-KO a differenziare solo verso linee astrocitarie a

discapito della loro capacità di differenziare a neuroni (Robson et al., 2018). EGFR è coinvolto anche nell'AD, in particolare potrebbe esistere una connessione fra PS1 ed EGFR. Neuroni di topi con PS1 inattiva mostrano una significativa riduzione nell'espressione di EGFR, indicando che il controllo trascrizionale su EGFR neuronale potrebbe essere regolato da PS1 (Bruban et al., 2015; Romano e Bucci, 2020). Inoltre, è stato osservato in modelli murini APP/PS1 che negli stadi avanzati di malattia i livelli di EGFR calano drasticamente (Wang et al., 2013).

### 1.6.3 SPOT14

SPOT14 (THRSP), una proteina omodimerica scoperta all'inizio degli anni '80 fra le proteine regolate dall'ormone della tiroide, è una proteina molto espressa in tessuti con un alto livello di lipogenesi (Colbert et al., 2010). Questa proteina, oltre a controllare la sintesi ed il metabolismo degli acidi grassi, è coinvolta nel processo di neurogenesi adulta. SPOT14 è altamente espresso in NPCs quiescenti. NPCs SPOT14+ sono in grado di generare neuroni ed astrociti (Knobloch et al., 2013) e rispondono a stimoli in grado di regolare positivamente la neurogenesi adulta. Il meccanismo più importante mediante il quale SPOT14 è in grado di influenzare la neurogenesi adulta è il controllo della *de novo* lipogenesi: le NPCs in attiva proliferazione attuano un'upregolazione delle vie del segnale coinvolte nella lipogenesi. SPOT14 è in grado di bloccare questa upregolazione nelle NPCs quiescenti riducendo i livelli di malonil-CoA (il quale è un importante substrato per la sintesi degli acidi grassi). Inoltre, una downregolazione di SPOT14 nelle NPCs produce un aumento della loro attivazione (Knobloch, 2017).

### 1.6.4 $\alpha 2\delta 1$

$\alpha 2\delta 1$  (CACNA2D1) è una subunità dei canali del calcio voltaggio-dipendenti (VGCC) di tipo L, T o N presenti in corteccia, talamo, ipotalamo, ippocampo e cervelletto. La funzione principale di questa subunità è quella di controllare la quantità di calcio che passa attraverso il canale. La porzione alfa della subunità è interamente esterna alla membrana mentre la porzione delta ha il C-terminale intracellulare e l'N-terminale extracellulare. È stata dimostrata una funzione proneurogenica della subunità  $\alpha 2\delta 1$ : NPCs ippocampali indifferenziate estratte da topi adulti trattate con gabapentin o pregabalin (a concentrazioni coerenti con l'affinità di binding dei farmaci alla subunità) ha prodotto un significativo aumento del differenziamento neuronale sia *in vitro* che *in vivo* (Valente et al., 2012).

### 1.6.5 GLT-1

GLT-1 è un trasportatore per il glutammato. Questo trasportatore regola l'uptake di glutammato in eccesso dallo spazio extrasinaptico ed è presente in NPCs, cellule neuronali e astrocitarie; ha un ruolo fondamentale nel prevenire l'eccitotossicità in caso di eccesso di glutammato nel vallo sinaptico (Rimmele e Rosenberg, 2016). È stata inoltre ipotizzata l'importanza di questo trasportatore nella neurogenesi adulta nell'ippocampo: GLT-1 è infatti in grado di mediare la regolazione del differenziamento delle NPCs ippocampali verso il fenotipo neuronale piuttosto che astrocitario. Con l'invecchiamento fisiologico l'espressione di GLT-1 sembra diminuire e il declino è fortemente accelerato in modelli murini Alzheimer (Masliah et al., 2000). Nel modello murino APP/PS1 una downregolazione di GLT-1 è associata ad un aumento della vulnerabilità del cervello ai danni causati dalle proteine mutate favorendo l'esordio di deficit cognitivi, probabilmente a causa della perdita di protezione dall'eccitotossicità (Mookherjee et al., 2011).

### 1.6.6 GluR2

GluR2 è una subunità dei recettori-canale AMPA del glutammato. I canali AMPA sono un eterotetramero costituito da 4 subunità GluR responsabili della trasmissione sinaptica eccitatoria in tutto l'encefalo. La subunità GluR2 è la subunità più finemente regolata dei recettori AMPA ed è necessaria per un corretto funzionamento della trasmissione nervosa eccitatoria. GluR2 è importante per regolare le proprietà fisiche e biochimiche del canale quali conduttanza, permeabilità al calcio e processi di potenziamento a lungo termine (Isaac et al., 2007). Nel cervello sano, oltre il 95% delle subunità GluR2 va incontro a RNA editing al sito Q/R, che permette la sostituzione della glutammina in posizione 607 con un'arginina, mentre nel cervello di pazienti con AD questo meccanismo è fortemente compromesso con conseguente incremento della permeabilità del canale al calcio. Sebbene l'assenza di editing Q/R durante l'embriogenesi sembri portare ad un aumento della proliferazione delle NPCs e ad un differenziamento neuronale (Whitney et al., 2008), nell'adulto l'assenza di editing Q/R può causare neurodegenerazione, riduzione del numero di spine dendritiche, crisi epilettiche e deficit cognitivi (Wright et al., 2023). È inoltre noto come in pazienti con AD l'espressione di GluR2 sia generalmente downregolata nell'ippocampo (Carter et al., 2004) mentre nelle altre nicchie neurogeniche non sono vi sono studi sull'espressione di GluR2 nella malattia.

### 1.6.7 mGluR3

mGluR3 è un recettore facente parte della famiglia dei recettori metabotropici del glutammato, in particolare del gruppo II. È un recettore inibitorio accoppiato a proteine  $G_i/G_o$  e nel sistema nervoso la sua attivazione porta all'inibizione del rilascio del glutammato dai terminali nervosi presinaptici, oltre ad essere a monte di molte vie di segnale neurogliali (Niswender e Conn, 2010). Questo recettore è implicato sia nella neurogenesi adulta che nelle patologie neurodegenerative. *In vitro*, un'inibizione farmacologica e selettiva di mGluR3 su NPCs estratte dalla SGZ e SVZ di topi adulti causa una riduzione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, suggerendo che l'attivazione endogena di mGluR3 possa supportare la proliferazione delle NPCs nelle nicchie neurogeniche (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005). Si ritiene inoltre che una deregolazione degli mGluR del gruppo II possa giocare un ruolo importante nell'accumulo di  $\beta$ -amiloide poiché è stato osservato che l'attivazione di mGluR3 può avere un'azione protettiva contro la tossicità  $A\beta$ -indotta e contro l'eccitotossicità. È stato visto che l'attivazione di questo recettore in colture neuronali è in grado di prevenire l'eccitotossicità NMDA-indotta, probabilmente attraverso un meccanismo paracrino TGF- $\beta$ 1 mediato (Caraci et al., 2011; Srivastava et al., 2020), mentre in un altro studio è stato osservato che in colture neuronali l'attivazione di mGluR3 è stata in grado di diminuire la tossicità  $A\beta$ -indotta attraverso un meccanismo simile (Srivastava et al., 2020).

## 2. Scopo del lavoro

La nicchia neurogenica ipotalamica nell'adulto è un tema ancora poco approfondito nella letteratura scientifica, nonostante un interesse in forte crescita negli ultimi decenni abbia portato alla caratterizzazione dei tipi cellulari che formano questo ambiente e siano stati delineati alcuni dei meccanismi implicati nella regolazione dell'omeostasi neurogenica in questa regione (Haan et al., 2013, Robins et al., 2013, Son et al., 2021, Makrygianni & Chrousos, 2023). Il crescente interesse per quest'area è dovuto al fatto che la neurogenesi ipotalamica possa essere coinvolta in diverse funzioni regolatorie della regione e che permettono di garantire l'omeostasi del nostro organismo (Makrygianni & Chrousos, 2023). Ciò ha fatto crescere l'interesse per la neurogenesi ipotalamica non solo in condizioni fisiologiche, ma anche per le possibili implicazioni in diverse patologie, tra le quali AD. Come esposto in precedenza è nota una de-regolazione della neurogenesi adulta nell'AD e diverse molecole e fattori di trascrizione che agiscono sulla neurogenesi sono deregolati nell'AD, tanto da far pensare a un potenziamento della neurogenesi adulta come possibile target terapeutico nel ripristino dei deficit cognitivi indotti dalla malattia (Sung et al., 2020; Mishra et al., 2022). In questo senso la letteratura scientifica si è concentrata interamente sulla neurogenesi adulta ippocampale poiché l'ippocampo svolge un ruolo primario nella gestione dei processi riguardanti la memoria e l'apprendimento, funzioni fortemente compromesse in pazienti con AD. Tuttavia, diversi studi recenti evidenziano l'importanza anche dell'ipotalamo e di segnali provenienti da esso nella regolazione della memoria (Mavanji et al., 2017; Burdakov e Peleg-Raibstein, 2020). In particolare, i neuroni orexinerfici ipotalamici sembrano essere coinvolti in vari tipi di memoria, tra cui la memoria associativa e la memoria spaziale ippocampo-dipendente (Mavanji et al., 2017). Sembra esserci un coinvolgimento dell'ipotalamo anche nella risposta condizionata alla paura: è stata osservata, in ratti esposti ad uno stimolo che causa paura, una comunicazione fra ippocampo e ipotalamo attraverso proiezioni bidirezionali dei neuroni orexinerfici che collegano le due regioni. I segnali trasmessi dall'ippocampo raggiungono l'ipotalamo attraverso i circuiti neuronali orexinerfici, l'ipotalamo agisce come amplificatore dei segnali ed è in grado di scatenare una risposta ormonale attraverso l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Canteras et al., 1997; Burdakov e Peleg-Raibstein, 2020). È inoltre noto che l'AD è in grado di interferire con la corretta funzionalità dell'ipotalamo a causa dell'accumulo di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari in vari nuclei ipotalamici, provocando disfunzioni nel

controllo endocrino ipotalamo-mediato e riducendo il numero di neuroni orexinergici (Loskutova et al., 2010; Fronczek et al., 2012; Vercrusse et al., 2018).

Nel laboratorio di Neuroplasticità, da alcuni anni, si studiano le alterazioni delle proprietà dei progenitori neurali adulti sia in condizioni fisiologiche che patologiche, tra cui l'AD. Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare i livelli di espressione di diversi trascritti coinvolti nell'AD e nella regolazione della neurogenesi adulta utilizzando progenitori ipotalamici provenienti dal modello murino APP/PS1 di AD e dalla controparte WT al fine di valutarne una eventuale deregolazione. Tramite l'utilizzo di RealTime PCR abbiamo confrontato i livelli di espressione genica di otto trascritti al fine di indagare se fossero deregolati nei progenitori ipotalamici provenienti da animali APP/PS1 ai primi stadi della malattia (6 mesi) rispetto a progenitori provenienti da topi WT della stessa età.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 Estrazione dell'mRNA da pellet di NPC's ipotalamiche.

L'mRNA è stato ottenuto da pellet di  $3 \times 10^6$  cellule progenitrici neurali ipotalamiche (NPCs HYT), derivate da topi maschi e femmine APP/PS1 e WT C57BL/6j di 6-7 mesi di età e preparate in due diverse occasioni e a tre passaggi diversi in coltura.

Nel dettaglio:

1<sup>a</sup> preparazione di cellule da n = 3 maschi WT e 3 maschi APP/PS1; isolamento di RNA effettuato a passaggi in vitro p20, p23, p27.

2<sup>a</sup> preparazione n = 2 femmine WT e 2 femmine APP/PS1; isolamento di RNA effettuato a passaggi in vitro p6, p12, p18).

Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> non trattate (NUNC Termo Fisher Scientific T25) e fatte crescere in apposito terreno di proliferazione completo composto da: Neurobasal-A (GIBCO), 1% di supplemento B27 (GIBCO), 2mM L-glutammina (GIBCO), 10 ng/mL FGF-2 (Peprotech), 20 ng/mL di EGF (Peprotech), 4 µg/mL Eparina (Acros), 100 U o 100 µg/mL penicillina/streptomina (GIBCO). Dopo circa una settimana dalla piastratura è stato possibile osservare all'interno della fiaschetta la formazione delle prime neurosfere, indice del fatto che le NSCs e le NPC's hanno iniziato a proliferare. Una volta raggiunto un numero sufficiente le neurosfere vengono dissociate enzimaticamente per la prima volta (p1) e successivamente vengono dissociate ogni 5 giorni. La dissociazione è eseguita incubando le NPC's in 0,25% tripsina/EDTA (GIBCO) per 5 minuti a 37°C. La tripsina, enzima responsabile della dissociazione enzimatica delle neurosfere, viene successivamente inattivata mediante l'aggiunta di 1 mL di ovomucoide (70.000 U/mL, GIBCO). Viene poi eseguito un lavaggio addizionando 3 mL di HBSS (GIBCO), centrifugando per 10 minuti a 1000 rpm a T ambiente. Il surnatante viene rimosso e il pellet viene risospeso in terreno completo, dopodichè si procede con la conta al microscopio ottico delle cellule vive e morte, utilizzando il metodo di colorazione *trypan blue* in camera di Burker. Le cellule vengono successivamente piastrate in terreno completo in una fiasca da 25 cm<sup>2</sup> ad una densità di 12.000 cellule/cm<sup>2</sup>.

La procedura di estrazione dell'mRNA è stata eseguita utilizzando il kit per l'estrazione AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (50) (Qiagen, cod. 80004).

Per ogni campione, sono state utilizzate  $3 \times 10^6$  cellule. La procedura di estrazione è stata eseguita come segue:

a ciascun pellet di cellule sono stati aggiunti 350  $\mu$ L di RLT Buffer (buffer di lisi) e il lisato è stato omogeneizzato e successivamente trasferito in una colonna che lega il DNA (DNA spin column), centrifugando per 30 secondi a 10.000 rpm. L'eluato, contenente l'RNA e le proteine, è stato utilizzato per la purificazione dell'RNA. Sono stati aggiunti all'eluato 250  $\mu$ L di etanolo 100% e sono stati trasferiti 700  $\mu$ L del campione in una colonna che lega l'RNA (RNeasy spin column), centrifugando per 15 secondi a 10.000 rpm (8.000 x g). Sono stati poi aggiunti 700  $\mu$ L di Buffer RW1 (buffer di lavaggio) alla colonna e si è centrifugato per 15 secondi a 10.000 rpm per lavare la membrana della colonna. L'eluato è stato scartato e alla stessa colonna sono stati aggiunti 500  $\mu$ L di Buffer RPE (secondo buffer di lavaggio), centrifugando per 15 secondi a 10.000 rpm. L'eluato è stato nuovamente scartato e alla stessa colonna sono stati ancora aggiunti 500  $\mu$ L di Buffer RPE, centrifugando per 2 minuti a 10.000 rpm. Infine la colonna è stata trasferita in una nuova eppendorf da 1,5 mL e sono stati aggiunti 30  $\mu$ L di acqua (*RNase-free*), centrifugando per 1 minuto a 10.000 rpm per eluire l'RNA.

### 3.2 Retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA

La concentrazione e la purezza del mRNA estratto sono stati misurati utilizzando il Nanodrop (Implen). Il rapporto A260/A280 è stato utilizzato per valutare la purezza dell'RNA, mentre il rapporto A260/A230 è stato utilizzato per valutare la presenza di contaminanti.

Per la retrotrascrizione dell'mRNA a cDNA è stato utilizzato un kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, cod. A3800).

Per ogni campione sono state preparate due mix.

La MIX-1 con un volume finale di 5  $\mu$ L per ogni campione, composta da: 1  $\mu$ L di Oligo(dT), una quantità di  $\mu$ L di RNA pari a massimo 1  $\mu$ g e una quantità di acqua (*RNase-free*) che permetta di raggiungere il volume finale. La MIX-1 è stata successivamente riscaldata per 5 minuti a 70°C (Thermomixer comfort, Eppendorf) e messa poi in ghiaccio per 5 minuti.

La MIX-2 con volume finale di 7,7  $\mu\text{L}$  per ogni campione, composta da: 4  $\mu\text{L}$  di Buffer (ImProm-II 5x Reaction Buffer), 1,2  $\mu\text{L}$  di  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  di dNTP (Mix 10 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  di inibitore di RNasi (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor) e 1  $\mu\text{L}$  di enzima RT (ImProm-II™ Reverse Transcriptase).

Infine, è stata preparata la MIX finale di 20  $\mu\text{L}$  contenente 5  $\mu\text{L}$  di MIX-1, 7,7  $\mu\text{L}$  di MIX-2 e 7,3  $\mu\text{L}$  di acqua *RNase-free*.

Sono stati preparati i controlli negativi tra cui: il RT-, cioè un campione senza l'enzima RT, per valutare eventuali contaminazioni; un C-, contenente tutti i componenti del kit a eccezione dell'RNA al fine di valutare la corretta funzionalità dell'enzima.

Le provette sono state inserite in un termociclatore impostato con il seguente programma:

Step 1: 25°C per 5 min

Step 2: 42°C per 60 min

Step 3: 70°C per 15 min

Step 4: 4°C

Il cDNA ottenuto è stato poi conservato ad una temperatura di -20°C.

### 3.3 RealTime-qPCR

Il cDNA è stato utilizzato per eseguire delle RT-qPCR al fine di valutare l'espressione dei geni d'interesse (vedi *Tabella 1*).

Sono state preparate due mix. La MIX1 con un volume finale di 12  $\mu\text{L}$  contenente 10  $\mu\text{L}$  di Sybr Green (iTaq Universal SYBR® Green Supermix, Bio-Rad) e 2  $\mu\text{L}$  di *primer working solution* (PWS). La MIX-2 con un volume finale di 8  $\mu\text{L}$ , composta da 7,8  $\mu\text{L}$  di acqua distillata e 0,2  $\mu\text{L}$  di cDNA. Una volta centrifugate entrambe le mix di 12  $\mu\text{L}$  MIX-1 e 8  $\mu\text{L}$  MIX-2 sono state caricate su di una piastra a 96 pozzetti (Hard-Shell®, Bio-Rad), ottenendo un volume finale di 20  $\mu\text{L}$ /pozzetto.

Per preparare la PWS sono state utilizzate due differenti soluzioni: una *forward primer solution* (FPS) e una *reverse primer solution* (RPS). Dalla soluzione madre sia di FPS che di RPS (concentrazione 100  $\mu\text{M}$ ) sono stati prelevati 15  $\mu\text{L}$  e diluiti per raggiungere una concentrazione finale di 3  $\mu\text{M}$  in acqua distillata (volume finale di 500  $\mu\text{L}$ ). Vengono poi

prelevati 15  $\mu$ L dalla FPS, 15  $\mu$ L dalla RPS e vengono miscelati con 470  $\mu$ L di acqua distillata, allestendo la PWS.

Tutti i campioni, per ogni coppia di primer (*forward* e *reverse*), sono stati analizzati in triplicato tecnico. È stata eseguita anche la RT-qPCR per campioni RT- (nei quali mRNA non è retrotrascritto) e C- (senza cDNA); s18 è stato utilizzato come gene *housekeeping*.

Successivamente la piastra è stata sigillata utilizzando una pellicola adesiva (Microseal® “B” Adhesive Seals, Bio-Rad), ed inserita nel termociclatore:

Step 1: 95 °C per 3 minuti

Step 2: 95 °C per 30 secondi

Step 3: X °C per 30 secondi ← Dipendente dalla temperatura di *melting* dei primer (vedere *Tabella 1*)

Step 4: 72 °C per 15 secondi

Step 5: torna allo step 2, x 40 volte

*Tabella 1.* Sono stati testati i seguenti primer (Metabion):

Primer	Sequenza 5'-3'	Temperatura di melting (°C)
s18 for	TGC GAG TAC TCA ACA CCA ACA	59
s18 rev	CTG CTT TCC TCA ACA CCA CA	58
mAdam10 for	ATG GTG TTG CCG ACA GTG TTA	59
mAdam10 rev	GTT TGG CAC GCT GGT GTT TTT	59
mAp2a2 for	CCG ACA TCC GCA ACT GTA AAA	59
mAp2a2 rev	AGC TTC CAT GTG TCC AAA GTC	59
mEGFR for	GCC ATC TGG GCC AAA GAT ACC	63
mEGFR rev	GTC TTC GCA TGA ATA GGC CAA T	60
mThrsp for	ATG CAA GTG CTA ACG AAA CGC	59
mThrsp rev	CCT GCC ATT CCT CCC TTG G	62

mCacna2d1 for	GTC ACA CTG GAT TTT CTC GAT GC	63
mCacna2d1 rev	GGG TTT CTG AAT ATC TGG CCT GA	63
mGLT1 for	CTG GTG CAA GCC TGT TTC C	59
mGLT1 rev	TAG TTT CTT CAG GGG CCT CG	60
mGria2 for	TTC TCC TGT TTT ATG GGG ACT GA	61
mGria2 rev	CTA CCC GAA ATG CAC TGT ATT CT	61
mGluR3 for	TCA TTG CAG GAG TCA TTG GC	58
mGluR3 rev	TGG CAA AAT AAT CAT AGC GCG A	58

### 3.4 Analisi statistica

I grafici e l'analisi statistica per la RT-qPCR sono stati eseguiti utilizzando GraphPad Prism 8. I livelli relativi di ogni trascritto di interesse sono stati calcolati normalizzando relativamente a s18 e sui campioni provenienti dai topi WT, utilizzando il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . I dati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard (SD) ed analizzati mediante l'*unpaired Student's t-test*. Sono state considerate statisticamente significative le analisi con valore  $p < 0,05$ .

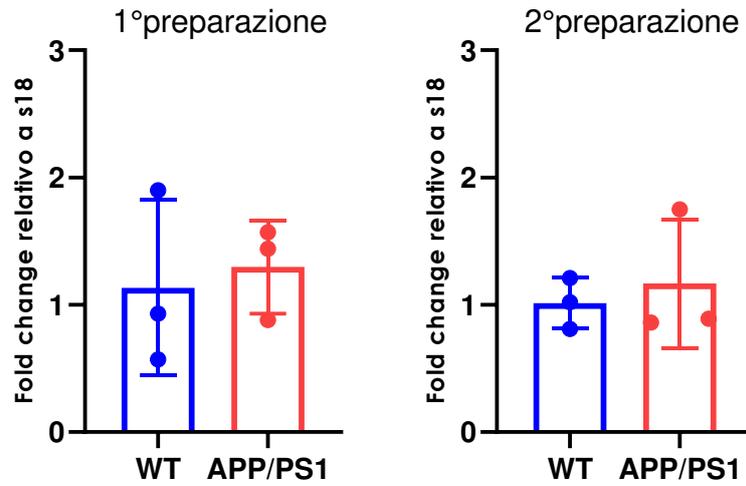
## 4. Risultati

### 4.1 Analisi dei trascritti di ADAM10 e AP-2 in progenitori ipotalamici derivati da topi wild type e APP/PS1

ADAM10 è una proteina di membrana, una metallo-proteasi con attività  $\alpha$ -secretasica, coinvolta nel taglio di diverse proteine target, tra cui APP (Kuhn et al., 2010). Nell'AD si assiste a un incremento dell'endocitosi di ADAM10 e quindi ad una riduzione della sua localizzazione in membrana. I nostri collaboratori dell'Università di Milano hanno recentemente dimostrato che l'endocitosi di ADAM10 è mediata dalla clatrina, dovuta al legame con la proteina adattatrice AP-2. Nell'ippocampo di topi APP/PS1, l'aumento dell'endocitosi di ADAM10 causa una diminuzione dell'espressione post-sinaptica dell'enzima, una riduzione della degradazione di APP tramite la via non-amiloidogena e una conseguente diminuzione dell'effetto protettivo dato dall'azione di ADAM nel prevenire la generazione di A $\beta$  (Marcello et al., 2013; Musardo et al., 2022). Vista l'espressione di ADAM10 in topi adulti sani nell'area attorno al terzo ventricolo (regione in cui sono localizzati anche i taniciti) (Guo et al., 2016) e la diminuzione della popolazione neuronale che avviene in quest'area, e nell'ipotalamo in generale, nell'AD (Baloyannis et al., 2018), abbiamo voluto valutare tramite Real Time PCR i livelli di espressione di ADAM10 e AP-2 nelle NPCs ipotalamiche provenienti da topi APP/PS1 e dalla controparte WT, utilizzati come controllo. Confrontando il genotipo APP/PS1 rispetto a quello WT, non si osserva una differenza statisticamente significativa nell'espressione di ADAM10 ( $p = 0,74$  e  $p = 0,65$ ) (**Fig.5A**) e AP-2 ( $p = 0,37$  e  $p = 0,40$ ) (**Fig.5B**) nelle NPCs ipotalamiche APP/PS1 rispetto al WT.

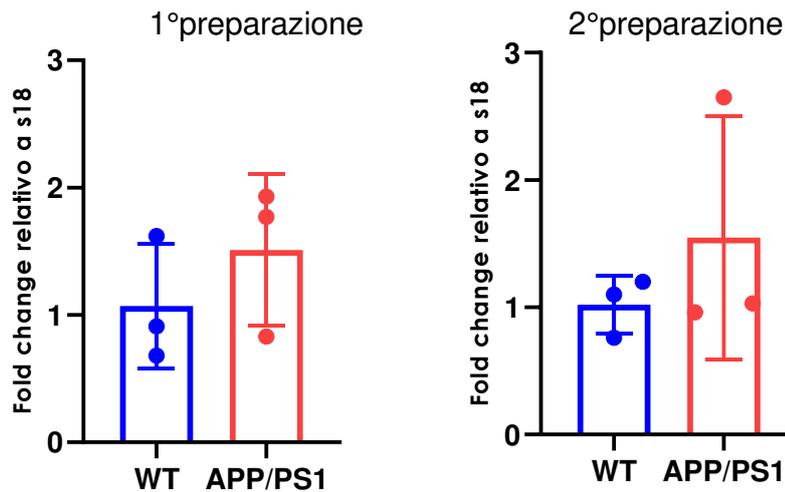
## ADAM10

A



## AP-2

B



**Figura 5. Analisi quantitativa dei trascritti ADAM10 e AP-2:** Sono stati valutati i livelli di espressione genica di ADAM10 (A) e AP-2 (B) ottenuti dall'RNA estratto da NPCs HYT WT e APP/PS1. I dati sono espressi come media  $\pm$  SD fold change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) del gene target/s18 di due diverse preparazioni cellulari, indicate come 1 e 2 a tre diversi passaggi *in vitro*. Ogni punto nel grafico rappresenta un campione ripetuto in triplicato. Per l'analisi statistica è stato utilizzato l'unpaired Student's t-test.

## 4.2 Analisi di trascritti coinvolti nella regolazione della neurogenesi adulta in NPCs ipotalamiche derivate da topi WT e APP/PS1

La neurogenesi ipotalamica adulta ha un impatto importante su diverse funzioni quali regolazione del metabolismo e del peso corporeo, dell'equilibrio idro-salino, della temperatura corporea, del ciclo sonno-veglia, della crescita (Kostin et al., 2019) e dell'invecchiamento (Zhang et al., 2017, Makrygianni & Chrousos, 2023). Ad oggi sono molto limitati gli studi su modificazioni della espressione genica in progenitori neurali adulti in modelli animali di AD. Da qualche tempo nel laboratorio di Neuroplasticità abbiamo avviato studi ma essi sono stati finora principalmente focalizzati sui progenitori ippocampali. Questo è il primo studio preliminare svolto su progenitori ipotalamici.

La scelta dei trascritti da analizzare in questa tesi sperimentale è stata guidata dai risultati di una precedente analisi proteomica sulle cellule progenitrici neurali ippocampali derivate da topi modello di malattia di Alzheimer (*dati preliminari, non pubblicati*), in collaborazione con il Prof. Marcello Manfredi, DIMET, UPO. In tale studio sono state identificate come proteine differenzialmente espresse in topi AD e corrispondenti WT le seguenti proteine: EGFR,  $\alpha 2\delta 1$ , SPOT14.

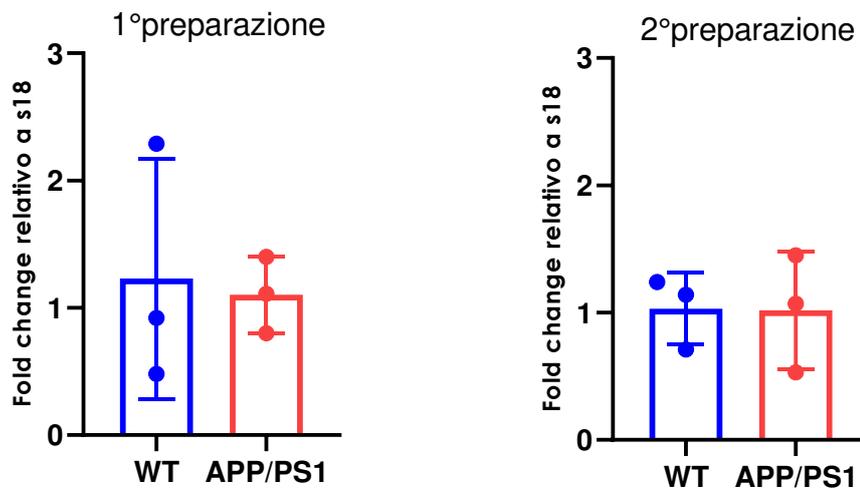
**EGFR** è un recettore tirosin-chinasico legato al mantenimento del *pool* di staminali ed è un fattore fondamentale per la proliferazione di precursori neurali in tutte le nicchie neurogeniche conosciute (Romano e Bucci, 2020). **SPOT 14** è un fattore di trascrizione legato alla lipogenesi *de novo* e al metabolismo lipidico, un importante marker di staminalità e regolatore della proliferazione di NPCs adulte la cui sovraespressione è legata a deficit cognitivi (Knobloch et al., 2014).  **$\alpha 2\delta 1$**  è una subunità dei canali del calcio voltaggio-dipendenti (VGCC), anch'essa coinvolta nel potenziamento della neurogenesi, essendo in grado di promuovere il differenziamento neuronale delle NPCs nell'ippocampo di topi adulti in seguito a stimolazione con ligandi farmacologici (Valente et al., 2012).

Abbiamo dunque valutato tramite Real Time PCR come l'espressione di questi trascritti variasse nelle NPCs ipotalamiche provenienti da topi APP/PS1 e WT. L'analisi effettuata non ha dimostrato una differenza significativa nell'espressione di EGFR ( $p = 0,84$  e  $p = 0,97$ ) nelle NPCs ipotalamiche provenienti dal modello APP/PS1 rispetto ai WT, in entrambe le preparazioni esaminate (**Fig. 6A**). L'espressione di SPOT14 mostra invece una significativa

sovraregolazione nel modello APP/PS1 rispetto al WT in entrambe le preparazioni ( $p = 0,03$  e  $p = 0,04$ ) (**Fig. 6B**). L'espressione di  $\alpha 2\delta 1$  mostra differenze significative solo nella prima preparazione, con un aumento nei progenitori APP/PS1 rispetto ai WT ( $p = 0,01$ ), mentre nella seconda preparazione l'espressione è simile in entrambi i gruppi ( $p = 0,87$ ) (**Fig. 6C**).

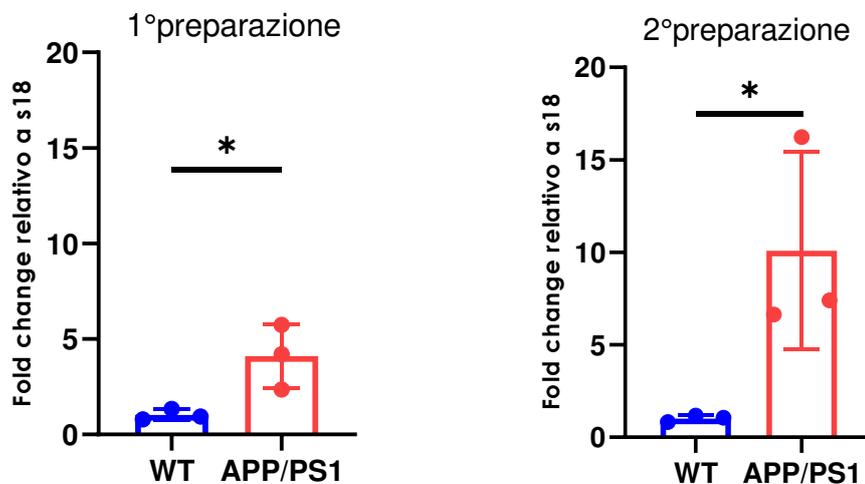
## EGFR

A



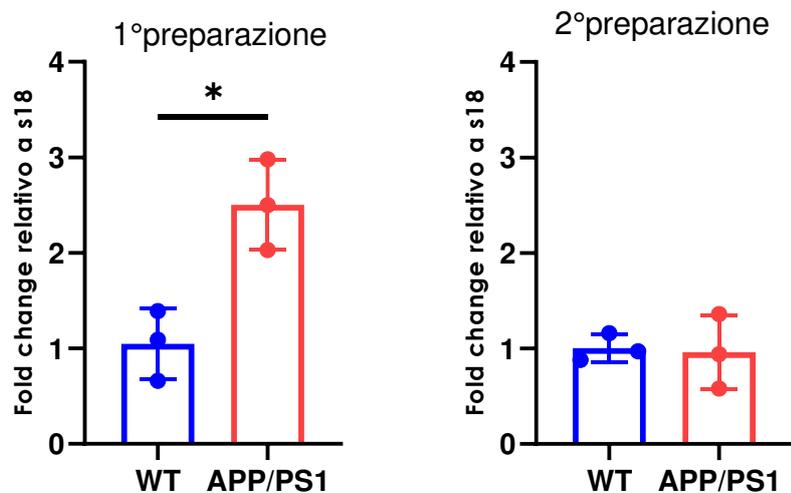
## SPOT14

B



## $\alpha 2\delta 1$

C



**Figura 6. Confronto dei livelli trascrizionali di geni selezionati tra NPCs *HYT* WT e *APP/PS1*:** i grafici mostrano i livelli di RNA per geni specifici rilevati in NPCs *HYT* di WT e *APP/PS1*: *EGFR* (A), *SPOT14* (B) e  $\alpha 2\delta 1$  (C). I dati sono espressi come media  $\pm$  SD fold change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) del gene target/s18 di due diverse preparazioni cellulari, indicate come 1 e 2 a tre diversi passaggi *in vitro*. Ogni punto nel grafico rappresenta un campione ripetuto in triplicato. \*  $p < 0.05$  vs WT. Per l'analisi statistica è stato utilizzato l'unpaired Student's t-test.

### 4.3 Analisi di trascritti coinvolti nella omeostasi del glutammato in progenitori neurali ipotalamici derivati da topi WT e APP/PS1

Un ruolo importante nella regolazione della neurogenesi ipotalamica è quello del neurotrasmettitore glutammato. Infatti, la modulazione della trasmissione glutammatergica nelle nicchie neurogeniche è fondamentale sia per la proliferazione che per il differenziamento dei progenitori neurali adulti (Schlett, 2006). Inoltre, un'alterata omeostasi del glutammato può causare eccitotossicità, un processo potenzialmente coinvolto in patologie neurodegenerative tra cui AD (Yudkoff et al., 2005). Nella precedente analisi proteomica cui si è precedentemente accennato, sono risultate differenzialmente espresse nei progenitori ippocampali dei topi AD rispetto ai corrispondenti WT tre proteine coinvolte nell'omeostasi e/o nella neurotrasmissione glutammatergica ovvero GLT-1, GluR2, mGluR3 (*dati non pubblicati*).

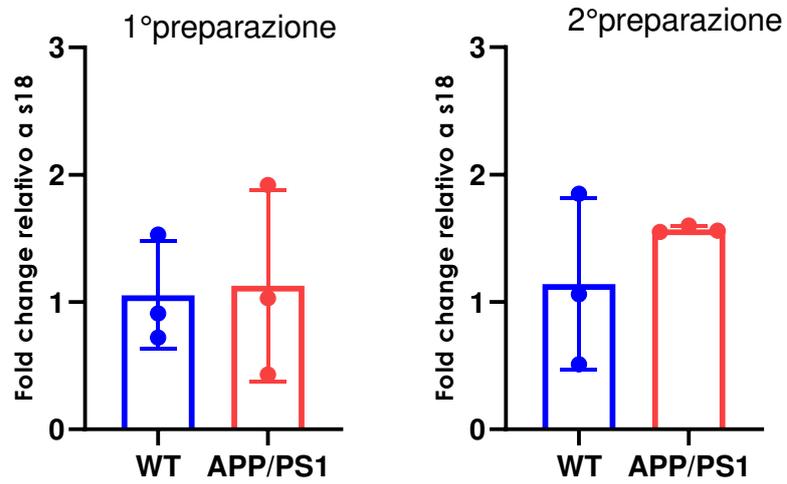
**GLT-1** è un trasportatore del glutammato in grado di regolare l'*uptake* del glutammato in eccesso dallo spazio extra-sinaptico; tramite questa azione svolge un ruolo fondamentale nel prevenire l'eccitotossicità causata da eccesso di glutammato circolante. La deregolazione di questo trasportatore favorisce l'insorgenza di deficit cognitivi in caso di malattie quali l'Alzheimer (Mookherjee et al., 2011). **GluR2** è una subunità dei recettori ionotropici AMPA del glutammato fondamentale per il corretto funzionamento della trasmissione eccitatoria nel cervello e deregolato nell'AD. **mGluR3** è un recettore inibitorio metabotropico del glutammato, coinvolto in numerose vie del segnale che regolano la neurogenesi. La sotto regolazione di questo recettore è legata a deficit cognitivi (Lainiola et al., 2014) ed anche in pazienti con AD è stata osservata una deregolazione di questa subunità (Srivastava et al., 2020).

Alla luce delle informazioni acquisite dall'analisi proteomica, i trascritti corrispondenti sono dunque stati oggetto di analisi mediante Real Time PCR in questa tesi sperimentale. Abbiamo dunque valutato come l'espressione di questi trascritti variasse nelle NPCs ipotalamiche provenienti da topi APP/PS1 e WT. Per quanto riguarda GLT-1 confrontando il genotipo APP/PS1 con quello WT, non si osserva una differenza significativa ( $p = 0,89$  e  $p = 0,33$ ) nell'espressione del gene nelle NPCs ipotalamiche (**Fig. 7A**). L'espressione di GluR2 mostra invece, in entrambe le preparazioni, significativa sotto regolazione ( $p = 0,02$  e  $p = 0,01$ ) nel modello APP/PS1 rispetto al WT (**Fig. 7B**). Per quanto riguarda mGluR3,

effettuata nella sola preparazione 2, l'espressione genica non mostra differenze significative ( $p = 0,77$ ) nel modello APP/PS1 rispetto al WT (**Fig. 7C**).

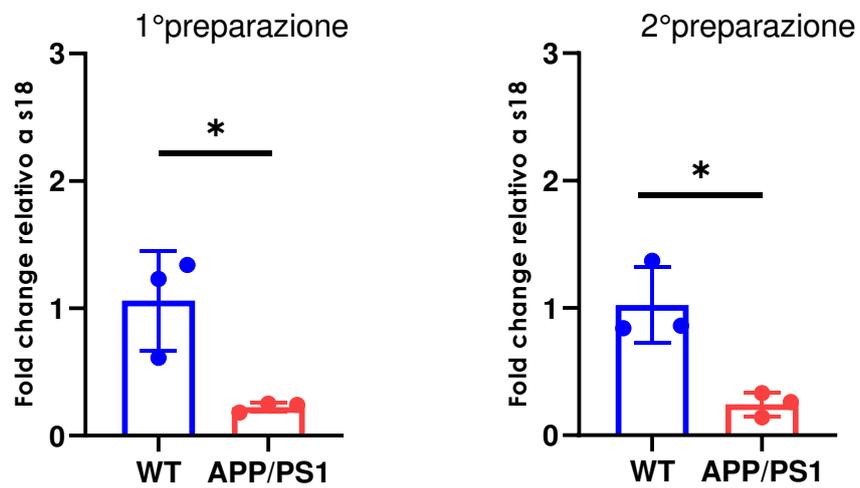
## GLT-1

A



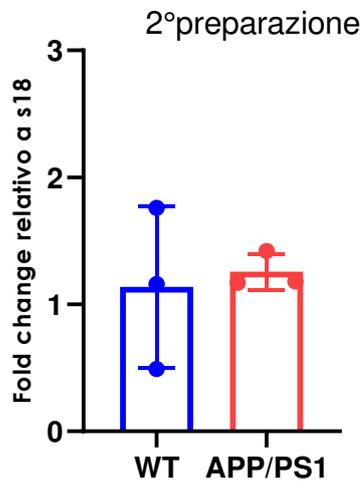
## GluR2

B



## mGluR3

C



*Figura 7. Analisi quantitativa di trascritti coinvolti nell'omeostasi del glutammato nelle NPCs HYT WT e APP/PS1: i grafici mostrano i livelli di RNA per geni specifici rilevati in NPCs HYT di WT e APP/PS1: GLT-1 (A), GluR2 (B) e mGluR3 (C). I dati sono espressi come media  $\pm$  SD fold change ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) del gene target/s18 di due diverse preparazioni cellulari, indicate come 1 e 2 a tre diversi passaggi *in vitro*. Ogni punto nel grafico rappresenta un campione ripetuto in triplicato. \*  $p < 0.05$  vs WT. Per l'analisi statistica è stato utilizzato l'unpaired Student's t-test.*

## 5. Discussione e conclusioni

La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa progressiva ed è la più diffusa forma di demenza (circa il 60% delle persone con demenza nel mondo sono affette da AD) con numeri in continuo aumento (World-Alzheimer-Report-2023). La malattia è caratterizzata da un lento declino di diverse funzioni cognitive con disturbi legati alla memoria e al linguaggio, disturbi neuropsichiatrici e disturbi del tono dell'umore (Rabinovici, 2019). Questa patologia è caratterizzata dalla presenza di placche amiloidi extracellulari, ovvero depositi insolubili di peptide A $\beta$ , e dalla presenza di grovigli neurofibrillari a livello intracellulare, ossia ammassi derivati da iperfosforilazione della proteina Tau (Scheltens et al., 2021).

L'ipotalamo è una struttura cerebrale fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo: è implicata nella regolazione di diverse funzioni, tra cui il metabolismo energetico, l'appetito, l'equilibrio idro-salino, la crescita, il ciclo sonno-veglia, la regolazione della temperatura corporea, la risposta neuroendocrina allo stress e l'espressione degli stati emotivi (Makrygianni e Chrousos, 2023). Sono stati evidenziati coinvolgimenti dei nuclei ipotalamici anche in aspetti riguardanti la memoria, soprattutto attraverso il reclutamento di circuiti neuronali orexinergici e connessioni con l'ippocampo (Mavanji et al., 2017; Burdakov e Peleg-Raibstein, 2020). Recentemente è stato dimostrato che l'ipotalamo è sede di neurogenesi adulta. Studi *in vitro* e *in vivo* (Xu et al., 2005; Lee et al., 2012) hanno rilevato la presenza di una nicchia neurogenica ipotalamica, un microambiente in grado di ospitare le cellule staminali neurali e controllarne sviluppo, maturazione e differenziamento. È stato ipotizzato che le NPC ipotalamiche appartengano a una popolazione di RGL specializzate chiamate taniciti, con i corpi cellulari situati nel terzo ventricolo e che proiettano nel parenchima ipotalamico o verso i capillari dell'eminenza mediana (Bolborea e Dale, 2013), consentendo il contatto diretto con il liquido cefalorachidiano, caratteristica unica rispetto alle altre popolazioni di NSC conosciute. La neurogenesi ipotalamica ha attirato l'interesse della comunità scientifica soltanto negli ultimi anni ed è quindi meno caratterizzata rispetto ad altre nicchie neurogeniche adulte, la SGZ e la SVZ.

Nell'AD, così come in altre malattie neurodegenerative, si verifica una forte riduzione della neurogenesi adulta. Nell'ippocampo in particolare, il processo subisce un importante declino

osservato sia in tessuti cerebrali umani che in modelli murini AD come APP/PS1 (Moreno-Jiménez et al., 2019; Tobin et al., 2019; Sung et al., 2020). L'effetto dell'AD sulla neurogenesi ipotalamica adulta è tuttavia ancora poco approfondito e studiato.

Nel laboratorio di Neuroplasticità da anni vengono studiati i progenitori neurali adulti in condizioni fisiologiche e patologiche, tra cui l'AD, ed in risposta a farmaci clinicamente rilevanti (Denis-Donini et al., 2008; Bortolotto et al., 2017; Bortolotto et al., 2019). Recentemente, oltre a studiare i progenitori adulti provenienti dalla regione ippocampale, abbiamo iniziato ad approfondire anche l'attività dei progenitori ipotalamici dimostrandone alcune peculiari differenze rispetto a quelli ippocampali. Avendo a disposizione, grazie alla collaborazione con le Professoressa Di Luca e Marcello dell'Università degli Studi di Milano, il modello murino APP/PS1 abbiamo analizzato tramite Real Time PCR i livelli di espressione di diversi trascritti coinvolti nella regolazione della neurogenesi adulta e/o correlati ad AD, confrontandoli con i topi di pari età WT. In questo lavoro di tesi ci siamo inizialmente concentrati su ADAM10 e AP-2. ADAM10 è una metalloproteasi di membrana con attività di  $\alpha$ -secretasi coinvolta nella degradazione di APP nel *pathway* non-amiloidogenico (Haass et al., 2012). Nell'ippocampo di pazienti con AD è stato ipotizzato un aumento dell'endocitosi di ADAM10 mediata da AP-2, che spiegherebbe la diminuzione dell'espressione post-sinaptica dell'enzima e una ridotta funzione neuroprotettiva di ADAM10 (Marcello et al., 2013; Musardo et al., 2022). Abbiamo analizzato i livelli di espressione dei trascritti ADAM10 e AP-2 in NPC's ipotalamiche, ma non abbiamo rilevato alcuna differenza nel genotipo APP/PS1 rispetto al WT. Ciò supporta l'idea che la ridotta funzione di ADAM10 in diversi tipi cellulari neurali di modelli murini di malattia sia principalmente dovuto a disturbo della sua endocitosi e non ad alterazioni della espressione genica.

Successivamente, ci siamo concentrati su alcune proteine che da letteratura o da studi del Laboratorio di Neuroplasticità risultano coinvolte nella regolazione della neurogenesi adulta: EGFR, SPOT14 e  $\alpha\delta 1$ . Dalle nostre analisi sulle NPC's ipotalamiche non sono emerse differenze significative nei livelli di espressione del trascritto EGFR nel modello APP/PS1 rispetto al WT. Ciò è in linea con dati preliminari ottenuti nel laboratorio secondo i quali non vi siano differenze nella capacità proliferativa in risposta a EGF delle cellule progenitrici ipotalamiche WT e APP/PS1.

SPOT14 è una proteina in grado di regolare la neurogenesi adulta tramite il controllo della *de novo* lipogenesi (Knobloch, 2017) ed una sua sovraespressione a livello proteico è stata associata a deficit cognitivi (Knobloch et al., 2014). Dalle nostre analisi abbiamo potuto osservare che, coerentemente con quanto già noto dagli studi su modelli AD in altre regioni (SGZ ed SVZ), anche nelle NPCs ipotalamiche da noi analizzate l'espressione del trascritto di SPOT14 mostra una significativa upregolazione nel modello APP/PS1 rispetto al WT, in linea con quanto osservato per la proteina in studi di proteomica (*dati non pubblicati*).  $\alpha 2\delta 1$  è una subunità dei VGCC coinvolta nella modulazione della quantità di calcio in grado di attraversare il canale ed è fondamentale nella formazione e organizzazione delle sinapsi glutammatergiche (Schöpf et al., 2021). È stata inoltre dimostrata una funzione proneurogenica di questa subunità quando legata da importanti farmaci usati in clinica ovvero pregabalin e gabapentin (Valente et al., 2012). Nelle NPCs ipotalamiche da noi analizzate abbiamo osservato dati opposti sui livelli di espressione del trascritto tra il genotipo APP/PS1 e quello WT nelle due diverse preparazioni e quindi, ad oggi, non possiamo concludere nulla a riguardo.

Infine, abbiamo valutato i livelli di espressione di trascritti coinvolti nella regolazione della trasmissione glutammatergica, importanti per il controllo della neurogenesi adulta e la cui deregolazione può provocare fenomeni di eccitotossicità (Yudkoff et al., 2005; Schlett, 2006). Abbiamo analizzato i livelli di espressione di un trasportatore e due recettori coinvolti nella trasmissione glutammatergica: GLT-1, GluR2 e mGluR3. È noto un ruolo di GLT-1 nel differenziamento delle NPCs ippocampali ed è stata osservata una riduzione fisiologica dell'espressione di questo trasportatore nell'invecchiamento, riduzione che può essere fortemente accelerata nell'AD (Masliah et al., 2000). Nei progenitori adulti ipotalamici analizzati in questo studio non abbiamo tuttavia riscontrato differenze significative nei livelli di espressione del trascritto fra il genotipo APP/PS1 e il WT. È noto come l'espressione di GluR2 sia generalmente downregolata nell'ippocampo di pazienti con AD (Carter et al., 2004). Dalla nostra analisi sulle NPCs ipotalamiche abbiamo rilevato che l'espressione del trascritto GluR2 è significativamente ridotta nel modello cellulare derivato da topi APP/PS1 rispetto a quelli WT. mGluR3 è un recettore metabotropico del glutammato, appartenente al gruppo II. È noto che l'attivazione di mGluR3 è in grado supportare la proliferazione delle NPCs nelle nicchie neurogeniche (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005) e che una deregolazione degli mGluR possa avere un ruolo importante nell'accumulo di A $\beta$  (Srivastava et al., 2020). Le analisi sulle NPC ipotalamiche, pur preliminari perché condotte solo su una delle

preparazioni cellulari però non hanno evidenziato livelli di espressione significativamente diversi dei trascritti tra APP/PS1 e WT.

In conclusione, questo studio si prefiggeva di analizzare i livelli di espressione di alcuni trascritti coinvolti nella malattia di Alzheimer e/o nella regolazione della neurogenesi adulta in progenitori neurali adulti ipotalamici da topi WT e topi APP/PS1. L'analisi, i cui risultati sono ancora preliminari e perciò richiedono conferma, suggerisce differenze nei livelli di espressione dei trascritti per SPOT14 e GluR2, i cui livelli di espressione risultano rispettivamente aumentati e diminuiti nel genotipo APP/PS1 rispetto a quello WT. Le informazioni ricavate da questo studio dovranno in seguito essere messe in relazione con i corrispondenti livelli di espressione proteica ed eventualmente studiati per capire l'impatto di queste alterazioni sulle proprietà delle cellule progenitrici neurali adulte.

## 6. Bibliografia

Ahmed EI, Zehr JL, Schulz KM, Lorenz BH, DonCarlos LL, Sisk CL. Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nat Neurosci*. 2008 Sep;11(9):995-7. doi: 10.1038/nn.2178.

Aisen PS, Gauthier S, Vellas B, Briand R, Saumier D, Laurin J, Garceau D. Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2007 Sep;4(4):473-8. doi: 10.2174/156720507781788882.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965 Jun;124(3):319-35. doi: 10.1002/cne.901240303.

Anand KS, Dhikav V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*. 2012 Oct;15(4):239-46. doi: 10.4103/0972-2327.1043239.

J. Baloyannis, Stavros, Ioannis Mavroudis, Demetrios Mitilineos, Ioannis S. Baloyannis, and Vassiliki G. Costa. 2018. 'The Hypothalamus in Alzheimer's Disease'. *Hypothalamus in Health and Diseases*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.81475.

Bartkowska K, Turlejski K, Koguc-Sobolewska P, Djavadian R. Adult Neurogenesis in the Mammalian Hypothalamus: Impact of Newly Generated Neurons on Hypothalamic Function. *Neuroscience*. 2023 Apr 1;515:83-92. doi: 10.1016/j.neuroscience.2023.02.012. Epub 2023 Feb 17.

Batailler M, Droguerre M, Baroncini M, Fontaine C, Prevot V, Migaud M. DCX-expressing cells in the vicinity of the hypothalamic neurogenic niche: a comparative study between mouse, sheep, and human tissues. *J Comp Neurol*. 2014 Jun 1;522(8):1966-85. doi: 10.1002/cne.23514.

Berg DA, Bond AM, Ming GL, Song H. Radial glial cells in the adult dentate gyrus: what are they and where do they come from? *F1000Res*. 2018 Mar 5;7:277. doi: 10.12688/f1000research.12684.1.

Bhole RP, Chikhale RV, Rathi KM. Current biomarkers and treatment strategies in Alzheimer disease: An overview and future perspectives. *IBRO Neurosci Rep*. 2023 Nov 30;16:8-42. doi: 10.1016/j.ibneur.2023.11.003.

Bjornsson CS, Apostolopoulou M, Tian Y, Temple S. It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Dev Cell*. 2015 Feb 23;32(4):435-46. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.010.

Bless EP, Yang J, Acharya KD, Nettles SA, Vassoler FM, Byrnes EM, Tetel MJ. Adult Neurogenesis in the Female Mouse Hypothalamus: Estradiol and High-Fat Diet Alter the Generation of Newborn Neurons Expressing Estrogen Receptor  $\alpha$ . *eNeuro*. 2016 Sep 22;3(4):ENEURO.0027-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0027-16.2016.

Bolborea M, Dale N. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci*. 2013 Feb;36(2):91-100. doi: 10.1016/j.tins.2012.12.008. Epub 2013 Jan 17.

Bonds JA, Kuttner-Hirshler Y, Bartolotti N, Tobin MK, Pizzi M, Marr R, Lazarov O. Presenilin-1 Dependent Neurogenesis Regulates Hippocampal Learning and Memory. *PLoS One*. 2015 Jun 22;10(6):e0131266. doi: 10.1371/journal.pone.0131266.

Bordey, Angelique. (2005). The Postnatal Subventricular Zone: A Source of New Cells in This Old Brain. *Nepal Journal of Neuroscience*. 2. 12. 10.3126/njn.v2i1.19977.

Bortolotto V, Mancini F, Mangano G, Salem R, Xia E, Del Grosso E, Bianchi M, Canonico PL, Polenzani L, Grilli M. Proneurogenic Effects of Trazodone in Murine and Human Neural Progenitor Cells. *ACS Chem Neurosci*. 2017 Sep 20;8(9):2027-2038. doi: 10.1021/acschemneuro.7b00175. Epub 2017 Jul 3.

Bortolotto V, Bondi H, Cuccurazzu B, Rinaldi M, Canonico PL, Grilli M. Salmeterol, a  $\beta$ 2 Adrenergic Agonist, Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in a Region-Specific Manner. *Front Pharmacol*. 2019 Sep 12;10:1000. doi: 10.3389/fphar.2019.01000.

Bruban J, Voloudakis G, Huang Q, Kajiwara Y, Al Rahim M, Yoon Y, Shioi J, Gama Sosa MA, Shao Z, Georgakopoulos A, Robakis NK. Presenilin 1 is necessary for neuronal, but not glial, EGFR expression and neuroprotection via  $\gamma$ -secretase-independent transcriptional mechanisms. *FASEB J*. 2015 Sep;29(9):3702-12. doi: 10.1096/fj.15-270645. Epub 2015 May 18.

Burdakov D, Peleg-Raibstein D. The hypothalamus as a primary coordinator of memory updating. *Physiol Behav*. 2020 Sep 1;223:112988. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.112988. Epub 2020 May 30.

Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull.* 1997;44(3):297-305. doi: 10.1016/s0361-9230(97)00141-x.

Caraci F, Molinaro G, Battaglia G, Giuffrida ML, Riozzi B, Traficante A, Bruno V, Cannella M, Merlo S, Wang X, Heinz BA, Nisenbaum ES, Britton TC, Drago F, Sortino MA, Copani A, Nicoletti F. Targeting group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors for the treatment of psychosis associated with Alzheimer's disease: selective activation of mGlu2 receptors amplifies beta-amyloid toxicity in cultured neurons, whereas dual activation of mGlu2 and mGlu3 receptors is neuroprotective. *Mol Pharmacol.* 2011 Mar;79(3):618-26. doi: 10.1124/mol.110.067488. Epub 2010 Dec 15.

Carter TL, Rissman RA, Mishizen-Eberz AJ, Wolfe BB, Hamilton RL, Gandy S, Armstrong DM. Differential preservation of AMPA receptor subunits in the hippocampi of Alzheimer's disease patients according to Braak stage. *Exp Neurol.* 2004 Jun;187(2):299-309. doi: 10.1016/j.expneurol.2003.12.010.

Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, Lee SW, Pulli B, Clemenson GD, Kim E, Rompala A, Oram MK, Asselin C, Aronson J, Zhang C, Miller SJ, Lesinski A, Chen JW, Kim DY, van Praag H, Spiegelman BM, Gage FH, Tanzi RE. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science.* 2018 Sep 7;361(6406):eaan8821. doi: 10.1126/science.aan8821.

Colbert CL, Kim CW, Moon YA, Henry L, Palnitkar M, McKean WB, Fitzgerald K, Deisenhofer J, Horton JD, Kwon HJ. Crystal structure of Spot 14, a modulator of fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 2;107(44):18820-5. doi: 10.1073/pnas.1012736107. Epub 2010 Oct 15.

Denis-Donini S, Dellarole A, Crociara P, Francese MT, Bortolotto V, Quadrato G, Canonico PL, Orsetti M, Ghi P, Memo M, Bonini SA, Ferrari-Toninelli G, Grilli M. Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF-kappaB p50-deficient mice. *J Neurosci.* 2008 Apr 9;28(15):3911-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0148-08.2008.

Di Giorgi-Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, Ricci-Vitiani L, Ciceroni C, Busceti CL, Biagioni F, Iacovelli L, Canudas AM, Parati E, De Maria R, Nicoletti F. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of

neural progenitor cells. *Cell Death Differ.* 2005 Aug;12(8):1124-33. doi: 10.1038/sj.cdd.4401639.

Endres K, Deller T. Regulation of Alpha-Secretase ADAM10 In vitro and In vivo: Genetic, Epigenetic, and Protein-Based Mechanisms. *Front Mol Neurosci.* 2017 Mar 17;10:56. doi: 10.3389/fnmol.2017.00056.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998 Nov;4(11):1313-7. doi: 10.1038/3305.

Evans J, Sumners C, Moore J, Huentelman MJ, Deng J, Gelband CH, Shaw G. Characterization of mitotic neurons derived from adult rat hypothalamus and brain stem. *J Neurophysiol.* 2002 Feb;87(2):1076-85. doi: 10.1152/jn.00088.2001.

Fronczek R, van Geest S, Frölich M, Overeem S, Roelandse FW, Lammers GJ, Swaab DF. Hypocretin (orexin) loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012 Aug;33(8):1642-50. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.014. Epub 2011 May 5.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature.* 2006 Feb 2;439(7076):589-93. doi: 10.1038/nature04404. Epub 2005 Dec 11.

Ghosal K, Stathopoulos A, Pimplikar SW. APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS One.* 2010 Jul 30;5(7):e11866. doi: 10.1371/journal.pone.0011866.

Guo ZB, Su YY, Wang YH, Wang W, Guo DZ. The expression pattern of Adam10 in the central nervous system of adult mice: Detection by in situ hybridization combined with immunohistochemistry staining. *Mol Med Rep.* 2016 Sep;14(3):2038-44. doi: 10.3892/mmr.2016.5501. Epub 2016 Jul 11.

Haan N, Goodman T, Najdi-Samiei A, Stratford CM, Rice R, El Agha E, Bellusci S, Hajihosseini MK. Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J Neurosci.* 2013 Apr 3;33(14):6170-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2437-12.2013.

Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 2004 Feb 11;23(3):483-8. doi: 10.1038/sj.emboj.7600061. Epub 2004 Jan 29.

Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 May;2(5):a006270. doi: 10.1101/cshperspect.a006270.

Hick M, Herrmann U, Weyer SW, Mallm JP, Tschäpe JA, Borgers M, Mercken M, Roth FC, Draguhn A, Slomianka L, Wolfer DP, Korte M, Müller UC. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APP $\alpha$  in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol.* 2015 Jan;129(1):21-37. doi: 10.1007/s00401-014-1368-x. Epub 2014 Nov 29. Erratum in: *Acta Neuropathol.* 2015 Jan;129(1):161-2.

Homem CC, Repic M, Knoblich JA. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Nov;16(11):647-59. doi: 10.1038/nrn4021. Epub 2015 Sep 30.

Hu YS, Xu P, Pigino G, Brady ST, Larson J, Lazarov O. Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DeltaE9</sup> mice. *FASEB J.* 2010 Jun;24(6):1667-81. doi: 10.1096/fj.09-136945. Epub 2010 Jan 19.

Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron.* 2007 Jun 21;54(6):859-71. doi: 10.1016/j.neuron.2007.06.001.

Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.* 2004 Jan 15;13(2):159-70. doi: 10.1093/hmg/ddh019. Epub 2003 Nov 25.

Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 6;101(1):343-7. doi: 10.1073/pnas.2634794100. Epub 2003 Dec 5.

Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 3;99(18):11946-50. doi: 10.1073/pnas.182296499. Epub 2002 Aug 14.

Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Sep 1;7(9):a018812. doi: 10.1101/cshperspect.a018812.

Knobloch M, Braun SM, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Araúzo-Bravo MJ, Kovacs WJ, Karalay O, Suter U, Machado RA, Roccio M, Lutolf MP, Semenkovich CF, Jessberger S. Metabolic control of adult neural stem cell activity by Fasn-dependent lipogenesis. *Nature*. 2013 Jan 10;493(7431):226-30. doi: 10.1038/nature11689. Epub 2012 Dec 2.

Knobloch M, von Schoultz C, Zurkirchen L, Braun SM, Vidmar M, Jessberger S. SPOT14-positive neural stem/progenitor cells in the hippocampus respond dynamically to neurogenic regulators. *Stem Cell Reports*. 2014 Nov 11;3(5):735-42. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.013. Epub 2014 Sep 26.

Knobloch M. The Role of Lipid Metabolism for Neural Stem Cell Regulation. *Brain Plast*. 2017 Nov 9;3(1):61-71. doi: 10.3233/BPL-160035.

Kögel D, Deller T, Behl C. Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. *Exp Brain Res*. 2012 Apr;217(3-4):471-9. doi: 10.1007/s00221-011-2932-4. Epub 2011 Nov 16.

Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):679-83. doi: 10.1126/science.1115360.

Kostin A, Alam MA, McGinty D, Szymusiak R, Alam MN. Chronic Suppression of Hypothalamic Cell Proliferation and Neurogenesis Induces Aging-Like Changes in Sleep-Wake Organization in Young Mice. *Neuroscience*. 2019 Apr 15;404:541-556. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.053. Epub 2019 Feb 8.

Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. 2010 Sep 1;29(17):3020-32. doi: 10.1038/emboj.2010.167. Epub 2010 Jul 30.

Lainiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behav Brain Res.* 2014 Jun 1;266:94-103. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.008. Epub 2014 Mar 11.

Lee, D., Bedont, J., Pak, T. et al. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* 15, 700–702 (2012). <https://doi.org/10.1038/nn.3079>

Li G, Bien-Ly N, Andrews-Zwilling Y, Xu Q, Bernardo A, Ring K, Halabisky B, Deng C, Mahley RW, Huang Y. GABAergic interneuron dysfunction impairs hippocampal neurogenesis in adult apolipoprotein E4 knockin mice. *Cell Stem Cell.* 2009 Dec 4;5(6):634-45. doi: 10.1016/j.stem.2009.10.015.

Li J, Tang Y, Cai D. IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol.* 2012 Oct;14(10):999-1012. doi: 10.1038/ncb2562. Epub 2012 Sep 2.

Li J, Tang Y, Purkayastha S, Yan J, Cai D. Control of obesity and glucose intolerance via building neural stem cells in the hypothalamus. *Mol Metab.* 2014 Feb 4;3(3):313-24. doi: 10.1016/j.molmet.2014.01.012.

Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature.* 2005 Oct 27;437(7063):1370-5. doi: 10.1038/nature04108.

Llorente V, Velarde P, Desco M, Gómez-Gaviro MV. Current Understanding of the Neural Stem Cell Niches. *Cells.* 2022 Sep 26;11(19):3002. doi: 10.3390/cells11193002.

Loskutova N, Honea RA, Brooks WM, Burns JM. Reduced limbic and hypothalamic volumes correlate with bone density in early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(1):313-22. doi: 10.3233/JAD-2010-1364.

Makrygianni EA, Chrousos GP. Neural Progenitor Cells and the Hypothalamus. *Cells.* 2023 Jul 11;12(14):1822. doi: 10.3390/cells12141822.

Marcello E, Saraceno C, Musardo S, Vara H, de la Fuente AG, Pelucchi S, Di Marino D, Borroni B, Tramontano A, Pérez-Otaño I, Padovani A, Giustetto M, Gardoni F, Di Luca M.

Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *J Clin Invest*. 2013 Jun;123(6):2523-38. doi: 10.1172/JCI65401. Epub 2013 May 8.

Marín-Burgin A, Mongiat LA, Pardi MB, Schinder AF. Unique processing during a period of high excitation/inhibition balance in adult-born neurons. *Science*. 2012 Mar 9;335(6073):1238-42. doi: 10.1126/science.1214956. Epub 2012 Jan 26.

Martínez-Cerdeño V, Noctor SC. Neural Progenitor Cell Terminology. *Front Neuroanat*. 2018 Dec 6;12:104. doi: 10.3389/fnana.2018.00104.

Masliyah E, Alford M, Mallory M, Rockenstein E, Moechars D, Van Leuven F. Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Exp Neurol*. 2000 Jun;163(2):381-7. doi: 10.1006/exnr.2000.7386.

Mavanji V, Butterick TA, Duffy CM, Nixon JP, Billington CJ, Kotz CM. Orexin/hypocretin treatment restores hippocampal-dependent memory in orexin-deficient mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2017 Dec;146:21-30. doi: 10.1016/j.nlm.2017.10.014. Epub 2017 Oct 28.

McMillan N, Kirschen GW, Desai S, Xia E, Tsirka SE, Aguirre A. ADAM10 facilitates rapid neural stem cell cycling and proper positioning within the subventricular zone niche via JAMC/RAP1Gap signaling. *Neural Regen Res*. 2022 Nov;17(11):2472-2483. doi: 10.4103/1673-5374.339007.

McNay DE, Briançon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest*. 2012 Jan;122(1):142-52. doi: 10.1172/JCI43134. Epub 2011 Dec 27.

Mendez MF. Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurol Clin*. 2017 May;35(2):263-281. doi: 10.1016/j.ncl.2017.01.005.

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):687-702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.

Mishra R, Phan T, Kumar P, Morrissey Z, Gupta M, Hollands C, Shetti A, Lopez KL, Maienschein-Cline M, Suh H, Hen R, Lazarov O. Augmenting neurogenesis rescues memory impairments in Alzheimer's disease by restoring the memory-storing neurons. *J Exp Med*. 2022 Sep 5;219(9):e20220391. doi: 10.1084/jem.20220391. Epub 2022 Aug 19.

Mookherjee P, Green PS, Watson GS, Marques MA, Tanaka K, Meeker KD, Meabon JS, Li N, Zhu P, Olson VG, Cook DG. GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model. *J Alzheimers Dis.* 2011;26(3):447-55. doi: 10.3233/JAD-2011-110503.

Morales AV, Mira H. Adult Neural Stem Cells: Born to Last. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Jun 4;7:96. doi: 10.3389/fcell.2019.00096.

Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, Ávila J, Llorens-Martín M. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2019 Apr;25(4):554-560. doi: 10.1038/s41591-019-0375-9. Epub 2019

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006 Jun 29;441(7097):1068-74. doi: 10.1038/nature04956.

Morrow CS, Porter TJ, Xu N, Arndt ZP, Ako-Asare K, Heo HJ, Thompson EAN, Moore DL. Vimentin Coordinates Protein Turnover at the Aggresome during Neural Stem Cell Quiescence Exit. *Cell Stem Cell.* 2020 Apr 2;26(4):558-568.e9. doi: 10.1016/j.stem.2020.01.018. Epub 2020 Feb 27.

Mu, Y., Gage, F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* 6, 85 (2011). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-85>

Musardo S, Therin S, Pelucchi S, D'Andrea L, Stringhi R, Ribeiro A, Manca A, Balducci C, Pagano J, Sala C, Verpelli C, Grieco V, Edefonti V, Forloni G, Gardoni F, Meli G, Di Marino D, Di Luca M, Marcello E. The development of ADAM10 endocytosis inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol Ther.* 2022 Jul 6;30(7):2474-2490. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.03.024. Epub 2022 Apr 4.

Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:295-322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.

O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 2011;34:185-204. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613.

Paul A, Chaker Z, Doetsch F. Hypothalamic regulation of regionally distinct adult neural stem cells and neurogenesis. *Science*. 2017 Jun 30;356(6345):1383-1386. doi: 10.1126/science.aal3839. Epub 2017 Jun 15.

Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenue A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 2004 May;113(10):1456-64. doi: 10.1172/JCI20864. Erratum in: *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(4):598.

Rabinovici GD. Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2019 Feb;25(1):14-33. doi: 10.1212/CON.0000000000000700.

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jäggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Hölscher C, Mathews PM, Jucker M. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*. 2006 Sep;7(9):940-6. doi: 10.1038/sj.embor.7400784. Epub 2006 Aug 11.

Rimmele TS, Rosenberg PA. GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int*. 2016 Sep;98:19-28. doi: 10.1016/j.neuint.2016.04.010. Epub 2016 Apr 26.

Rizzoti K, Lovell-Badge R. Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Apr 15;445:7-13. doi: 10.1016/j.mce.2016.08.020. Epub 2016 Aug 13.

Robins SC, Stewart I, McNay DE, Taylor V, Giachino C, Goetz M, Ninkovic J, Briancon N, Maratos-Flier E, Flier JS, Kokoeva MV, Placzek M.  $\alpha$ -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun*. 2013;4:2049. doi: 10.1038/ncomms3049.

Robson JP, Wagner B, Glitzner E, Heppner FL, Steinkellner T, Khan D, Petritsch C, Pollak DD, Sitte HH, Sibilina M. Impaired neural stem cell expansion and hypersensitivity to epileptic seizures in mice lacking the EGFR in the brain. *FEBS J*. 2018 Sep;285(17):3175-3196. doi: 10.1111/febs.14603. Epub 2018 Aug 4.

Romano R, Bucci C. Role of EGFR in the Nervous System. *Cells*. 2020 Aug 12;9(8):1887. doi: 10.3390/cells9081887.

Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2021 Apr 24;397(10284):1577-1590. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4. Epub 2021 Mar 2.

Schlett K. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(10):949-60. doi: 10.2174/156802606777323665.

Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz F, Schroeder A. Over-expression of two different forms of the alpha-secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behav Brain Res*. 2006 Dec 15;175(2):278-84. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.030. Epub 2006 Oct 2.

Schneider LS, DeKosky ST, Farlow MR, Tariot PN, Hoerr R, Kieser M. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of two doses of Ginkgo biloba extract in dementia of the Alzheimer's type. *Curr Alzheimer Res*. 2005 Dec;2(5):541-51. doi: 10.2174/156720505774932287.

Schöpf CL, Ablinger C, Geisler SM, Stanika RI, Campiglio M, Kaufmann WA, Nimmervoll B, Schlick B, Brockhaus J, Missler M, Shigemoto R, Obermair GJ. Presynaptic  $\alpha_2\delta$  subunits are key organizers of glutamatergic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Apr 6;118(14):e1920827118. doi: 10.1073/pnas.1920827118.

Shi Y, Chichung Lie D, Taupin P, Nakashima K, Ray J, Yu RT, Gage FH, Evans RM. Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*. 2004 Jan 1;427(6969):78-83. doi: 10.1038/nature02211.

Son JE, Dou Z, Kim KH, Wanggou S, Cha VSB, Mo R, Zhang X, Chen X, Ketela T, Li X, Huang X, Hui CC. *Irx3* and *Irx5* in *Ins2-Cre<sup>+</sup>* cells regulate hypothalamic postnatal neurogenesis and leptin response. *Nat Metab*. 2021 May;3(5):701-713. doi: 10.1038/s42255-021-00382-y. Epub 2021 Apr 15.

Srivastava A, Das B, Yao AY, Yan R. Metabotropic Glutamate Receptors in Alzheimer's Disease Synaptic Dysfunction: Therapeutic Opportunities and Hope for the Future. *J Alzheimers Dis*. 2020;78(4):1345-1361. doi: 10.3233/JAD-201146.

Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*. 2006 Dec;54(8):805-14. doi: 10.1002/glia.20407.

Sung PS, Lin PY, Liu CH, Su HC, Tsai KJ. Neuroinflammation and Neurogenesis in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 21;21(3):701. doi: 10.3390/ijms21030701.

Thal DR, Tomé SO. The central role of tau in Alzheimer's disease: From neurofibrillary tangle maturation to the induction of cell death. *Brain Res Bull.* 2022 Nov;190:204-217. doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.10.006. Epub 2022 Oct 13.

Tian Y, Chang JC, Fan EY, Flajolet M, Greengard P. Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 15;110(42):17071-6. doi: 10.1073/pnas.1315110110. Epub 2013 Sep 25.6.

Tobin MK, Musaraca K, Disouky A, Shetti A, Bheri A, Honer WG, Kim N, Dawe RJ, Bennett DA, Arfanakis K, Lazarov O. Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell.* 2019 Jun 6;24(6):974-982.e3. doi: 10.1016/j.stem.2019.05.003. Epub 2019 May 23.

Valente MM, Bortolotto V, Cuccurazzu B, Ubezio F, Meneghini V, Francese MT, Canonico PL, Grilli M.  $\alpha\delta$  ligands act as positive modulators of adult hippocampal neurogenesis and prevent depression-like behavior induced by chronic restraint stress. *Mol Pharmacol.* 2012 Aug;82(2):271-80. doi: 10.1124/mol.112.077636. Epub 2012 May 9.

Vercruyse P, Vieau D, Blum D, Petersén Å, Dupuis L. Hypothalamic Alterations in Neurodegenerative Diseases and Their Relation to Abnormal Energy Metabolism. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jan 19;11:2. doi: 10.3389/fnmol.2018.00002.

Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, Kern S, Ousset PJ, Maruff P, Skoog I, Verhey FRJ, Freund-Levi Y, Tsolaki M, Wallin ÅK, Olde Rikkert M, Soininen H, Spuru L, Zetterberg H, Blennow K, Scheltens P, Muniz-Terrera G, Visser PJ; Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative; AIBL Research Group; ICTUS/DSA study groups. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement.* 2019 Jul;15(7):888-898. doi: 10.1016/j.jalz.2019.04.001. Epub 2019 Jun 1.

Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C. Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal

neurogenesis. *J Neurosci*. 2007 Jun 20;27(25):6771-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5564-06.2007.

Walker LC. A $\beta$  Plaques. *Free Neuropathol*. 2020;1:1-31. doi: 10.17879/freeneuropathology-2020-3025. Epub 2020 Oct 30.1.

Wang L, Liang B, Zhong Y. Reduced EGFR level potentially mediates the A $\beta$ 42-induced neuronal loss in transgenic fruit fly and mouse. *Protein Cell*. 2013 Sep;4(9):647-9. doi: 10.1007/s13238-013-3043-8.

Wei LC, Shi M, Chen LW, Cao R, Zhang P, Chan YS. Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Nov 15;139(1):9-17. doi: 10.1016/s0165-3806(02)00509-6.

Wen PH, Hof PR, Chen X, Gluck K, Austin G, Younkin SG, Younkin LH, DeGasperi R, Gama Sosa MA, Robakis NK, Haroutunian V, Elder GA. The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol*. 2004 Aug;188(2):224-37. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.04.002.

Weselek G, Keiner S, Fauser M, Wagenführ L, Müller J, Kaltschmidt B, Brandt MD, Gerlach M, Redecker C, Hermann A, Storch A. Norepinephrine is a negative regulator of the adult periventricular neural stem cell niche. *Stem Cells*. 2020 Sep;38(9):1188-1201. doi: 10.1002/stem.3232. Epub 2020 Jun 25.

Whitney NP, Peng H, Erdmann NB, Tian C, Monaghan DT, Zheng JC. Calcium-permeable AMPA receptors containing Q/R-unedited GluR2 direct human neural progenitor cell differentiation to neurons. *FASEB J*. 2008 Aug;22(8):2888-900. doi: 10.1096/fj.07-104661. Epub 2008 Apr 10.

Winkelman MA, Koppes AN, Koppes RA, Dai G. Bioengineering the neurovascular niche to study the interaction of neural stem cells and endothelial cells. *APL Bioeng*. 2021 Mar 3;5(1):011507. doi: 10.1063/5.0027211.

Wright AL, Konen LM, Mockett BG, Morris GP, Singh A, Burbano LE, Milham L, Hoang M, Zinn R, Chesworth R, Tan RP, Royle GA, Clark I, Petrou S, Abraham WC, Vissel B. The Q/R editing site of AMPA receptor GluA2 subunit acts as an epigenetic switch regulating

dendritic spines, neurodegeneration and cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2023 Sep 28;18(1):65. doi: 10.1186/s13024-023-00632-5.

Wu L, Rosa-Neto P, Hsiung GY, Sadovnick AD, Masellis M, Black SE, Jia J, Gauthier S. Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci.* 2012 Jul;39(4):436-45. doi: 10.1017/s0317167100013949.

Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol.* 2005 Apr;192(2):251-64. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.12.021.

Yoo S, Blackshaw S. Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. *Prog Neurobiol.* 2018 Nov;170:53-66. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.04.001. Epub 2018 Apr 6.

Yudkoff M, Daikhin Y, Nissim I, Horyn O, Luhovyy B, Lazarow A, Nissim I. Brain amino acid requirements and toxicity: the example of leucine. *J Nutr.* 2005 Jun;135(6 Suppl):1531S-8S. doi: 10.1093/jn/135.6.1531S. Erratum in: *J Nutr.* 2005 Aug;135(8):2009.

Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells.* 2014 Jul 26;6(3):305-11. doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.305.

Zhang Y, Kim MS, Jia B, Yan J, Zuniga-Hertz JP, Han C, Cai D. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs. *Nature.* 2017 Aug 3;548(7665):52-57. doi: 10.1038/nature23282. Epub 2017 Jul 26. Erratum in: *Nature.* 2018 Aug;560(7719):E33.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2011 Jan 7;4:3. doi: 10.1186/1756-6606-4-3.

Zhuang J, Wei Q, Lin Z, Zhou C. Effects of ADAM10 deletion on Notch-1 signaling pathway and neuronal maintenance in adult mouse brain. *Gene.* 2015 Jan 25;555(2):150-8. doi: 10.1016/j.gene.2014.10.056. Epub 2014 Nov 1.

<https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2023/>