

## Marker proteici del danno ipossico-ischemico

Alessio CRESTINI, Paola PISCOPO,  
Lorenzo MALVEZZI CAMPEGGI e Annamaria CONFALONI

*Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

**Riassunto.** - La lesione ipossica perinatale è una delle maggiori cause di alterazione del normale sviluppo neurologico. Studi recenti su modelli animali hanno mostrato che eventi di natura ipossico-ischemica avviano un processo di riorganizzazione dell'architettura sinaptica che comporta modificazioni transitorie dell'espressione sia di proteine sinaptiche (sinapsina 1, SNAP 25, APP) che di proteine neuronali (MAP2, N-CAM, GAP-43, preseniline), attive durante l'ontogenesi del sistema nervoso. Per alcune di queste proteine, in seguito all'evento ipossico, si verificano modificazioni post-traduzionali, mentre altre sono interessate da insoliti eventi di trascrizione. Uno studio più approfondito sulle proteine associate alla plasticità sinaptica potrebbe fornire una preziosa chiave di lettura per la miglior comprensione dei meccanismi di recupero del sistema nervoso.

*Parole chiave:* marcatori proteici, ipossia-ischemia, modello animale, uomo.

**Summary** (*Protein marker of hypoxic-ischaemic damage*). - Perinatal hypoxic injury is the major cause of normal neural developmental alterations. Recent studies concerning animal models show that an hypoxic/ischaemic event triggers a process taking to a synaptic architecture reorganization which induces a transient change in the synaptic (synapsin 1, SNAP 25, APP) and neuronal (MAP2, N-CAM, GAP-43 and presenilins) protein expression. Here we review the post-translational modifications of some proteins after hypoxic-ischaemic events. A deeper study on synaptic proteins plasticity could give an important key for the understanding of the recovery mechanisms of the nervous system.

*Key words:* proteic markers, hypoxia-ischaemia, animal model, human.

### Introduzione

Il danno ipossico-ischemico cerebrale si verifica frequentemente in età neonatale in seguito ad episodi quali l'asfissia *intrapartum* o l'arresto respiratorio. Nonostante gli interventi terapeutici comunemente utilizzati, gli esiti di tali eventi possono manifestarsi con alcuni deficit neurologici quali la paralisi cerebrale, il ritardo mentale e l'epilessia. Gli effetti dell'ipossia-ischemia in età perinatale e nell'adulto, pur causati da processi degenerativi analoghi, mostrano differenze sostanziali; infatti, mentre nel neonato il tessuto nervoso è ancora metabolicamente immaturo [1] e, evento forse ancora più decisivo, adattato ad un ambiente povero di ossigeno, il tessuto cerebrale adulto, altamente differenziato, risulta particolarmente sensibile a variazioni della pressione relativa dell'ossigeno. E' stato osservato che mentre nell'adulto i processi neuronali di necrosi e apoptosi sono lenti [2], negli animali neonati, e presumibilmente negli infanti umani, la morte cellulare risulta molto più rapida, per cui i tempi effettivi per realizzare un efficace intervento terapeutico non dovrebbero superare le due-sei ore [3]. Tuttavia, il sistema nervoso centrale fetale, presenta notevoli capacità reattive ed adattative all'asfissia [4] per cui la maggior parte dei

neonati che presentano una severa acidemia nel momento del parto, mostrano, successivamente, un decorso postnatale privo di complicazioni [5].

Quando la perfusione cerebrale è troppo bassa per fornire un'adeguata ossigenazione, a livello cellulare ha inizio una cascata di eventi biochimici innescati da un deficit energetico con conseguente arresto della biosintesi delle proteine, grave acidosi, accumulo citoplasmatico di ioni  $Ca^{++}$ , perossidazione lipidica e rilascio del glutammato dalle vescicole sinaptiche [3]. La successiva riperfusione, invece di ristabilire un ambiente adeguato alla sopravvivenza delle cellule nervose, determina un ulteriore aggravamento del quadro clinico causato da un anomalo aumento della pressione nei capillari cerebrali con conseguente rilascio di radicali liberi, sintesi di ossido nitrico, sviluppo di reazioni infiammatorie ed una rinnovata attività eccitotossica del glutammato.

Sebbene a tutt'oggi si disponga di poche informazioni riguardanti i meccanismi plastici che consentono il rimodellamento assonale ed il recupero dell'efficacia sinaptica, questi, tuttavia, sono certamente coinvolti negli eventi successivi agli insulti di tipo ipossico-ischemico.

In modelli sperimentali condotti su roditori, tra i quali il gerbillo della Mongolia (*Meriones unguiculatus*), l'ischemia transitoria del prosencefalo determina un

pattern di morte neuronale che vede coinvolti la maggioranza dei neuroni piramidali ippocampali CA1 e la maggior parte di quelli inibitori polimorfici dell'ilo del giro dentato [6-9].

Alcuni autori hanno proposto che l'eccitazione propagata dalle cellule granulari del giro dentato ai neuroni piramidali ippocampali in CA1, sia il meccanismo attraverso il quale tali cellule muoiono nei quattro giorni successivi all'induzione dell'insulto ischemico [9, 10]. La morte neuronale e la perdita dell'organizzazione sinaptica determinano tuttavia un riadattamento dei neuroni resistenti, che orientano lo sviluppo delle loro terminazioni verso i distretti danneggiati, ristabilendo in parte, le connessioni sinaptiche.

E' stato rilevato che alcune proteine, note per il loro coinvolgimento nello sviluppo del sistema nervoso e nell'organizzazione del network neuronale, vengono riespresse inaspettatamente, in seguito ad insulti di tipo ischemico e nel corso di alcune malattie neurodegenerative [11-13]. Ad esempio, nell'ippocampo del gerbillo e del ratto dopo ischemia transitoria del prosencefalo si osserva l'induzione della SNAP-25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*), proteina coinvolta nella crescita assonale durante l'ontogenesi cerebrale, e fortemente indotta, dopo danno ischemico, nello "strato muscoide" dell'ippocampo [14-16]. Analogamente dopo ischemia, si osserva un aumento anche dell'RNA messaggero della GAP-43 (*growth associated protein of 43 kDa*) [17, 18].

L'articolo vuole rivisitare i recenti contributi forniti dai dati sperimentali in relazione ad alcune proteine normalmente espresse nel corso dell'ontogenesi, la cui induzione risulta aumentata o diminuita a seguito di episodi di ipossia-ischemia. Tali proteine possono risultare utili marcatori prognostici del danno neuronale causato da ipossia-ischemia cerebrale perinatale e dimostrarsi efficaci per la valutazione degli interventi farmaco-terapeutici e lo sviluppo di nuove terapie.

### La sinapsina I (*synapsin I*)

La sinapsina I è una fosfoproteina localizzata nella parte citoplasmatica interna delle vescicole sinaptiche della quale sono note due isoforme di *splicing* di 80 e 86 kDa [19]. La proteina viene sintetizzata nei corpi cellulari neuronali e trasferita con trasporto assonale [20], insieme alle principali proteine assonali e sinaptiche, ai terminali nervosi. La sinapsina I funge da substrato della CaMKII (protein chinasi calcio-calmodulina dipendente) e regola il legame ad elementi citoscheletrici quali l'actina, la tubulina ed i neurofilamenti, mediante fosforilazione.

Osservazioni al microscopio elettronico ed analisi di immunocitochimica hanno stabilito che la proteina forma legami contemporaneamente, sia con le vescicole sinaptiche che con il citoscheletro, principalmente con i

filamenti di actina [21-23]. Inoltre la fosforilazione della parte C-terminale della sinapsina facilita la sua dissociazione dall'actina citoscheletrica incrementando l'attività di esocitosi delle vescicole sinaptiche. Questo meccanismo, a sua volta, regola il rilascio del neurotrasmettitore dalle vescicole, influenzando l'efficienza della trasmissione sinaptica [24].

Durante lo sviluppo, la proteina viene espressa nel neuropilo, dove partecipa al differenziamento e alla maturazione funzionale delle sinapsi [25]. Il soma neuronale, i dendriti, i bulbi assonali, la glia e le cellule endoteliali invece, mostrano un basso livello di espressione. Dopo ischemia, la proteina tende a scomparire piuttosto tardivamente rispetto ad altri marcatori proteici, sia nell'emisfero ischemico coinvolto, che in quello controlaterale alla lesione, in quest'ultimo soprattutto nello strato molecolare del giro dentato.

La sinapsina I è stata studiata durante l'ipossia-ischemia cerebrale neonatale nel ratto, indotta unilateralmente attraverso occlusione della carotide sinistra e rilevata nei sinaptosomi, mediante elettroforesi ed *immunoblotting* [19]. L'analisi biochimica non mostra cambiamenti significativi dell'espressione nell'emisfero ischemico rispetto a quello normale. Tuttavia l'analisi della fosforilazione della sinapsina I decresce dopo ventuno ore sia nell'emisfero ischemico che in quello normale, dopo una settimana questa diminuzione risulta ancora più evidente e dopo un mese è rilevabile soltanto nell'emisfero ischemico per scomparire totalmente dopo tre mesi. Ulteriori esperimenti di ischemia cerebrale, con occlusione della carotide destra sono stati condotti sul cervello del gerbillo [26]. Nell'emisfero ischemico, l'immunoreattività della sinapsina inizia a scomparire dal talamo, dopo un giorno; dopo tre giorni non si osserva più nell'ippocampo, nella corteccia cerebrale e nella parte dorsale del *caudato-putamen*, per poi scomparire, dopo un mese, in tutto l'emisfero destro. Nell'emisfero non ischemico dopo tre giorni dall'ischemia si verifica un danno selettivo e quindi ha inizio una nuova sinaptogenesi nello strato molecolare del giro dentato. In tale emisfero vengono chiaramente rilevati sia una perdita di circa un terzo dell'immunoreattività della proteina, dovuta al danno selettivo delle terminazioni presinaptiche di questa regione, che un suo successivo recupero a seguito della sinaptogenesi *ex novo*. L'analisi biochimica mediante immunoblot, effettuata dopo 24 ore dall'episodio ischemico conferma i dati dell'immunoistochimica.

Sempre sul gerbillo, è stato condotto uno studio immunoistochimico, mediante occlusione "bilaterale" della carotide [24]. L'ischemia prodotta sperimentalmente, induce la morte cellulare sia dei neuroni piramidali dell'ippocampo che di quelli del giro dentato e dell'ilo, determinando un decremento dell'immunoreattività della proteina, soprattutto nella zona più interna

dello strato molecolare del giro dentato. Dopo due-quattro ore e fino ad una settimana dall'ischemia, l'immunoreattività rilevata subisce un aumento nelle terminazioni nervose dell'ilo e dello *stratum lucidum* nell'area CA3, come rilevato dall'analisi densitometrica che mostra un incremento della densità ottica del 200 per cento. Dopo una settimana, l'immunoreattività inizia a decrescere nella zona più interna dello strato molecolare e successivamente tale diminuzione tende ad estendersi anche alle terminazioni nervose dell'ilo e dello *stratum lucidum* dell'area CA3, fino a raggiungere i livelli dei controlli. Successivamente anche i livelli di immunoreattività della sinapsina nella zona più interna dello strato molecolare, tornano ad eguagliare i livelli tipici degli animali di controllo.

#### **SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25 kDa*)**

Anche la SNAP-25, coinvolta nell'ontogenesi, è inducibile in seguito ad un danno ipossico. La proteina, associata ai sinaptosomi, con un peso molecolare di 25 kDa fu inizialmente identificata come specifica dei neuroni [15]. La sua espressione, elevata durante la sinaptogenesi, risulta principalmente localizzata nei terminali nervosi e negli assoni [16]. La proteina, componente essenziale del meccanismo di esocitosi che conduce al rilascio del neurotrasmettitore, forma un complesso eterotrimerico, sia legandosi alla sinaptobrevina, presente sulla vescicola nella quale è contenuto il neurotrasmettitore, che alla syntaxina ancorata alla membrana plasmatica pre-sinaptica. Tale complesso, in presenza di ATP, si dissocia attivando una cascata di eventi che determina la fusione della vescicola sinaptica alla membrana pre-sinaptica [27].

Durante la fase iniziale dello sviluppo, il livello di espressione della SNAP-25 è molto basso, aumenta con la formazione delle sinapsi, per essere espressa in seguito, in modo rilevante, nei coni di crescita assonali [28]. La proteina, trasportata nelle terminazioni nervose pre-sinaptiche, svolge un ruolo chiave nella formazione e nella stabilizzazione delle terminazioni stesse [29]. La sua espressione è stata studiata mediante immunostochimica, nel gerbillo, dopo rapida induzione di ischemia cerebrale transitoria (5 min) effettuata mediante l'occlusione "bilaterale" della carotide [14].

In condizioni normali la SNAP-25 è rilevabile nell'ippocampo, ed in particolare, nel neuropilo dell'area CA1, all'interno dello strato muscoide e nello *stratum lucidum*. Dopo un giorno dall'induzione dell'ischemia, l'immunoreattività della SNAP-25 aumenta nello *stratum lucidum* e quindi la sua osservazione, dopo due, quattro ore e dopo una settimana, mostra il suo maggiore incremento nello strato muscoide più interno dell'ilo. Dopo una settimana, l'immunoreattività decresce nello strato molecolare del giro dentato, in seguito alla morte

dei neuroni dell'ilo che proiettano le innervazioni in questa area. A distanza di due settimane dalla lesione, la proteina aumenta in corteccia e nell'ippocampo, in particolare nello *strato oriens* e nel *radiatum*, oltre che nel giro dentato, indicando un reinnervamento dello strato molecolare.

Il pattern di immunoreattività osservato nel gerbillo è molto simile a quello descritto nei ratti e nei topi [16, 30], mentre non sono disponibili, al momento, dati relativi all'espressione della proteina nel cervello umano.

#### **GAP-43 (*growth associated protein - 43*)**

Solo dalla metà degli anni ottanta si giunse a comprendere che una serie di studi iniziati da un decennio riguardanti fosfo-proteine note come B-50, F1, neuromodulina, pp46 e GAP-43 avevano come protagonista un'unica proteina sinaptica implicata sia negli eventi dello sviluppo, sia nei cambiamenti di plasticità neurale del cervello maturo [31].

La GAP-43 è una proteina di 43 kDa strettamente associata allo strato citoplasmatico delle membrane terminali dei neuroni [32]. Essa è attualmente considerata il maggior substrato della protein-chinasi C nei compartimenti presinaptici ed è stato riportato che in risposta al fenomeno neuro-fisiologico del potenziamento a lungo termine (LTP) [33], può subire variazioni persistenti dello stato di fosforilazione. La proteina si lega alla calmodulina [34], con insolita modalità  $Ca^{2+}$ -indipendente e probabilmente, forma legami anche nei coni di crescita degli assoni [35] con due proteine del citoscheletro: l'actina e la spettrina. La GAP-43 regola, inoltre, l'inibizione di una classe di proteine G, che rappresenta uno degli eventi precoci nell'attivazione della crescita assonale [36, 37].

Esperimenti condotti su modelli animali hanno mostrato il ruolo fisiologico chiave svolto dalla proteina nella crescita e nell'arborizzazione dell'assone; infatti in topi transgenici l'inattivazione funzionale del gene, prodotta da mutazioni e delezioni, impedisce il corretto orientamento degli assoni [38], mentre l'espressione della proteina, oltre i livelli usuali, provoca una loro eccessiva arborizzazione [39].

In risposta ad eventi di tipo ipossico-ischemico è stato osservato un significativo incremento dei livelli d'espressione della GAP-43. Tale incremento è riconducibile alla capacità dei neuroni resistenti allo stimolo degenerativo di avviare un processo parzialmente compensatorio che è alla base del meccanismo di plasticità del sistema nervoso, di cui la proteina è un marcatore riconosciuto.

L'espressione di RNA messaggero della GAP-43 può essere normalmente osservabile in aree specifiche dell'ippocampo di ratto (CA1, CA2, CA3, ilo). Tuttavia,

in seguito all'induzione di ischemia globale è stato evidenziato un moderato ma precoce aumento di RNA messaggero sia nei neuroni dell'ilo che nelle cellule granulari del giro dentato [17]. I neuroni dell'area CA3, resistente alla degenerazione cellulare, dopo 3-5 giorni dallo stimolo ischemico mostrano un incremento analogo che suggerisce nuovamente un possibile meccanismo di tipo plastico necessario nel recupero delle connessioni assoniche nell'area CA1, dove si verifica, come precedentemente descritto, la completa scomparsa delle cellule neuronali.

Esperimenti di ischemia focale indotta nell'area parietale della corteccia, mostrano nel *nucleus basalis magnocellularis*, un aumento transitorio dei livelli di RNA messaggero della GAP-43, incremento che rimane ancora rilevante dopo una settimana dalla lesione [40]. Nel talamo, è osservabile un aumento analogo che tuttavia resta significativo soltanto nei primi tre giorni post-trauma. Anche le aree corticali limitrofe alla lesione presentano un incremento dei livelli di trascritto nei neuroni piramidali del quinto strato, che raggiunge il suo apice in tre giorni e resta rilevabile per due settimane.

Studi eseguiti mediante lesioni corticali hanno evidenziato un aumento dell'immunoreattività della GAP-43, nell'area che delimita il bordo della lesione ischemica (penombra) dopo tempi brevissimi d'induzione (sei ore) [41]. L'immunoreattività risulta localizzata sia nel soma cellulare, indice della neosintesi proteica, che nei coni d'emergenza degli assoni.

L'incremento simultaneo dell'espressione di altre proteine quali la MAP2 e la Ciclina D1, nella medesima area, può suggerire che tali variazioni siano parte di un tentativo di riparazione del danno cellulare, per preservare i neuroni parzialmente danneggiati. Alcuni autori basandosi su tali evidenze sostengono l'ipotesi che, in seguito al danno cellulare, i neuroni sembrano regredire ad uno stadio primitivo dello sviluppo neurale, con riattivazione di quelle proteine funzionalmente attive durante il ciclo cellulare ed espresse, normalmente, prima del differenziamento [41].

### MAP 2 (*microtubule associated protein 2*)

La proteina associata ai microtubuli 2 o MAP2 è attualmente considerata un marcatore del danno neuronale dendritico. Inizialmente venne identificata come una proteina strutturale necessaria, con gli altri componenti intracellulari quali l'actina, i neurofilamenti, ed i mitocondri, per mantenere la neuroarchitettura [42]. Risulta costituita da una coppia di polipeptidi del peso molecolare di 280 kDa (MAP2a e MAP2b) e da un'altra isoforma, meno abbondante nel cervello in sviluppo, di 70 kDa (MAP2c).

In condizioni normali la MAP2 è confinata nei neuroni; la sua espressione risulta maggiore nei dendriti, dove appare sia nell'albero dendritico e nelle spine

sinaptiche [43], che nei corpi cellulari [44], mentre è assente negli assoni [45]. La proteina sembra consolidare i processi neuronali [46] oltre a rappresentare un sito di legame sia per la protein chinasi cAMP dipendente [47, 48], sia per una chinasi calcio/calmodulina dipendente [49] enzimi responsabili della fosforilazione della MAP2, che potrebbero rivestire un ruolo fondamentale nel segnale del neurotrasmettitore [45].

La MAP2 è considerata un utile marcatore immunostochimico per lo studio dei terminali post-sinaptici e dei cambiamenti patologici osservati nei dendriti e nei corpi cellulari. Infatti, gli studi condotti indicano che le modificazioni ed il riarrangiamento della proteina possono monitorare una fase precoce indispensabile per l'avvio di numerosi processi che tendono a modificare la funzione neuronale. Come suggerito da numerosi esperimenti di danno ischemico, la proteina risulta essere un marcatore molto sensibile per tale tipo di danno [50-55]. Infatti, la perdita della MAP-2 può essere coinvolta nella fase iniziale della disfunzione neuronale e nella scomparsa dell'arborizzazione dendritica che può essere considerata, generandosi soltanto un'ora dopo l'ischemia cerebrale, un primo precoce segno di neurodegenerazione.

In particolare, la proteina è stata studiata in un modello di danno ipossico-ischemico "neonatale" nel ratto di sette giorni, la cui maturità cerebrale corrisponderebbe a quella del feto umano a termine. L'esperimento consiste nell'induzione ischemica "unilaterale", mediante occlusione della carotide sinistra seguita dall'osservazione dell'immunocolorazione della proteina dopo tre-tre ore e dopo uno-tre giorni dall'ischemia [56]. L'immunoreattività della MAP2, osservata in ratti appena nati rivela alterazioni precoci della proteina, soprattutto nella regione CA3 dell'ippocampo che normalmente, nei ratti adulti, non risulta vulnerabile al danno. Nella corteccia, la scomparsa della proteina è evidente già dopo tre ore, con una caratteristica colorazione "a colonna".

La perdita della MAP2 progredisce, quindi, nel tempo, in termini sia di dimensioni dell'area coinvolta che di intensità dell'immunocolorazione. Questo dato farebbe supporre una regressione rapida e transiente dell'immunoreattività della proteina da collegarsi alla perdita di antigenicità della MAP2 causata da fattori quali la fosforilazione della proteina stessa, tipica dell'età neonatale. Una perdita maggiore è rilevabile dopo tre giorni dall'induzione dell'ipossia-ischemia [57] mentre la sua scomparsa permanente è correlabile al danno citoscheletrico nei neuroni [51].

L'espressione della MAP2 è stata osservata con tecniche di immunocolorazione anche in un modello animale di ratto adulto. Dopo una rapida induzione di ischemia, l'immunoreattività della proteina risulta diminuita nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo e nel talamo dell'emisfero ipsilaterale. La sua perdita è massima a settantadue ore dall'ischemia soprattutto nel

giro dentato e nella regione CA1. L'emisfero controlaterale, invece, non presenta alterazioni immunostochimiche nell'espressione della proteina. In particolare sono stati rilevati due differenti tipi di danno neuronale, uno "reversibile" e l'altro di tipo "irreversibile". Il primo consiste nella perdita precoce della MAP2, mentre il secondo tipo è da correlarsi ad alterazioni simili che si verificano in uno stadio più tardivo e associabili alla morte neuronale che provoca la perdita delle sinapsi [58].

### $\beta$ -APP

La proteina precursore della  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -APP) è una glicoproteina transmembrana di tipo 1 espressa, preferenzialmente, nel cervello. Nell'uomo la proteina è codificata da un singolo gene sul cromosoma 21 che genera numerose isoforme a seguito di un taglio alternativo del suo RNA messaggero.

Le forme secrete di  $\beta$ -APP rilasciate nell'ambiente extracellulare sono di due tipi: quelle che presentano la regione KPI (*Kunitz-type protease inhibitor*), APP<sub>751</sub> e APP<sub>770</sub> e quelle in cui questa regione è assente (APP<sub>695</sub> e APP<sub>714</sub>). La forma neuronale dell'APP è quella costituita da 695 aminoacidi (APP 695). Come osservato da numerosi studi, tali isoforme mostrano localizzazioni diverse [59, 60] e la loro induzione, in risposta all'insulto ipossico-ischemico, avviene in maniera differente. Dopo ischemia, infatti, le isoforme contenenti la regione KPI subiscono un incremento della loro espressione che contribuisce, probabilmente, alla rigenerazione neuronale, mentre le altre due diminuiscono in relazione alla perdita neuronale.

Il precursore dell'amiloide, dopo essere stato sintetizzato, viene inviato, con trasporto assonale veloce [61], alle terminazioni nervose e localizzato nelle membrane sinaptiche dove svolge il ruolo di neuromodulatore. Inoltre nei neuroni ippocampali e in quelli corticali la  $\beta$ -APP ha un'attività protettiva contro gli insulti eccitotossici, attraverso un meccanismo che coinvolge la stabilizzazione dei livelli del calcio [62].

In seguito al danno ischemico l'espressione della  $\beta$ -APP aumenta soprattutto nei neuroni e negli astrociti, in relazione a vari meccanismi. Inizialmente la proteina aumenta a causa dell'incremento della sua sintesi o per diminuzione dell'efficienza del turn-over nei neuroni vulnerabili e negli astrociti della regione danneggiata. In un secondo momento l'APP è rilasciata dai neuroni degenerati e dagli astrociti vicini alla regione che ha subito l'insulto ischemico. Infine la  $\beta$ -APP aumenta nelle cellule del sangue come ad esempio le piastrine e viene trasportata dagli astrociti perivascolari [62]. In alcuni lavori è stato rilevato che la sovra-espressione di  $\beta$ -APP, indotta dall'insulto ipossico-ischemico nello strato di cellule piramidali produce neurotossicità [63, 64] mentre in altri casi promuove la neuroprotezione e la crescita

neuritica [65-67]. Un'ipotesi che potrebbe spiegare questa discrepanza funzionale è che l'APP, prodotta sia nelle cellule resistenti che in quelle vulnerabili, potrebbe svolgere ruoli diversi a seconda del grado di espressione del suo gene: livelli moderati di APP, favorirebbero la sopravvivenza del neurone, mentre alti livelli ne indurrebbero la morte cellulare per apoptosi.

L'espressione della  $\beta$ -APP è stata studiata nei cervelli di neonati umani e di ratto dopo insulto ipossico-ischemico, mediante *western blotting* ed immunostochimica [68]. Nel cervello dei neonati umani l'espressione della proteina inizia ad aumentare circa 24 ore dopo l'insulto ipossico-ischemico fino a raggiungere i livelli più elevati dopo 3 giorni dal danno cerebrale indotto. Questo incremento non è stato osservato soltanto nell'area danneggiata del cervello, ma anche in quella apparentemente non colpita da ischemia. Sembra quindi che l'induzione di  $\beta$ -APP sia frutto di una risposta adattativa del cervello neonatale al danno ipossico-ischemico.

Nei ratti, l'analisi biochimica mediante *western blotting* è stata studiata nella corteccia cerebrale, nello striato e nell'ippocampo dopo quattro-dodici ore dalla lesione e fino a tre giorni dal danno. È stato osservato che la proteina inizia ad aumentare dopo due ore, raggiungendo i suoi livelli più alti dopo un giorno dall'insulto ischemico.

L'espressione della  $\beta$ -APP è stata osservata anche nell'ippocampo del gerbillo [69] dopo induzione di ischemia cerebrale mediante occlusione bilaterale della carotide. Inizialmente si osserva una morte cellulare neuronale accompagnata da ipertrofia degli astrociti nei quali l'immunoreattività della  $\beta$ -APP risulta molto debole. Dopo una-quattro settimane dall'insulto ipossico-ischemico, gli astrociti, ormai iperplastici, mostrano una forte immunoreattività contro la  $\beta$ -APP, suggerendo che l'espressione della proteina sia associata alla proliferazione astrocitaria [70].

### Le preseniline 1 e 2

Identificate nel 1995 in seguito agli studi riguardanti una forma ad insorgenza particolarmente precoce della malattia di Alzheimer di tipo familiare, le preseniline 1 e 2 (PS1, PS2) sono codificate rispettivamente dai geni: S182 sul cromosoma 14 [71] e STM2 [72] sul cromosoma 1. Le due proteine integrali di membrana presentano un'omologia di sequenza del 67% ed entrambe sono divise in due frammenti ammino e carbossi-terminali di 30 e 18 kDa [73, 74] mediante un processo proteolitico non ancora ben caratterizzato.

L'iniziale localizzazione delle preseniline nel reticolo endoplasmatico ed in misura minore nel compartimento del Golgi ha permesso di elaborare modelli strutturali che prevedono da sette a nove domini trans-membrana oltre ad un *loop* idrofilico con i domini ammino e

carbossi-terminali orientati verso il citoplasma [75, 76]. Più recentemente studi immunocitochimici hanno rivelato che ambedue le proteine sono presenti sulla membrana plasmatica [77] in particolare nei compartimenti pre e post-sinaptici dei neuroni, anche se non è stato ancora definito se si tratti delle forme intere o di frammenti proteolitici [78].

Le preseniline sono espresse in una notevole varietà di tessuti ed organi [79] ed in particolare nel tessuto cerebrale embrionale ed in quello adulto, nel quale sono coinvolte nel processamento del precursore dell'amiloide [80]. Sebbene le funzioni fisiologiche rimangono fondamentalmente sconosciute, numerosi studi hanno assegnato alle due proteine un ruolo nella regolazione dei segnali intracellulari durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale [81], nel mantenimento dell'omeostasi dello ione  $Ca^{2+}$  [82] e nel fenomeno dell'apoptosi [83].

La funzione primaria svolta dalla PS1 durante l'embriogenesi [84] è stata in parte rivelata dagli studi condotti in topi *knock-out* (PS1  $-/-$ ) nei quali viene impedita la normale espressione della proteina. Gli animali PS1  $-/-$  muoiono prima o immediatamente dopo la nascita a causa di gravi difetti nella formazione dei somiti e dell'apparato scheletrico associati ad emorragie cerebrali. In tali modelli è stata documentata la diminuzione dell'espressione di importanti fattori per la trasduzione del segnale intracellulare (Notch e delta), da cui deriva l'ipotesi secondo la quale la PS1 rivestirebbe una funzione diretta o indiretta in queste vie di trasduzione [85, 86]. Nonostante le dimostrazioni che avvalorano il ruolo funzionale della presenilina nell'ontogenesi, sorprendentemente, la più alta espressione della PS1 è stata registrata nel cervelletto e nell'ippocampo, dieci giorni dopo la nascita. Tale dato suggerirebbe il coinvolgimento della PS1 in almeno due processi distinti rispettivamente attivi durante l'embriogenesi e lo sviluppo postnatale del sistema nervoso centrale [87].

Modelli transgenici *in vitro* ed *in vivo* sottoposti ad ipossia-ischemia hanno mostrato che l'espressione della presenilina 1 mutata induce una vulnerabilità statisticamente maggiore in risposta a stimoli pro-apoptotici, rispetto all'espressione della proteina nativa [88, 82]. In particolare colture cellulari transgeniche, poste in condizioni di ipossia e con riduzione di glucosio nel terreno di crescita, mostrano una soglia di sensibilità alla mancanza di ossigeno significativamente minore con aumento della mortalità cellulare. Anche gli esperimenti *in vivo* di ischemia focale cerebrale che utilizzano modelli transgenici mutati per la presenilina 1 mostrano un danno tissutale più severo ed un recupero comportamentale meno efficace, rispetto ai controlli che non esprimono PS1 mutata [89]. I modelli transgenici suddetti, inoltre, hanno permesso di dimostrare che la concentrazione degli ioni calcio, dopo induzione di stimoli ipossico-ischemici, dipende dalla presenza di mutazioni nella sequenza della PS1. L'effetto della presenilina

sull'omeostasi del calcio deriva, probabilmente, dall'interazione diretta con il recettore per la rianodina o proteine associate, che potrebbe svolgere un ruolo nel meccanismo precoce di attivazione dei processi apoptotici [90].

L'ipossia induce l'espressione di un fattore di trascrizione relativamente raro, l'HIF-1, che a sua volta implementa l'espressione della presenilina 2 legandosi a siti multipli presenti nel promotore del gene STM2. Infatti colture cellulari ipossiche di retina derivate da neonati di ratto mostrano un notevole aumento del legame del fattore HIF-1 al DNA, seguito da un incremento dell'RNA messaggero di PS2 che resta sovra-espresso per due-sette giorni [91]. Sempre in condizioni di stress ipossico si è potuta dimostrare l'espressione di un'isoforma della presenilina 2 in colture cellulari di neuroblastoma, analogamente a quanto avviene nei cervelli di pazienti Alzheimer; tale isoforma osservabile solo dopo ipossia, non compare in risposta a nessun altro tipo di induzione [92].

Esperimenti su modelli animali hanno permesso di osservare che l'induzione dello stress ipossico-ischemico produce, nei confini dell'area colpita da infarto, un accumulo di epitopi della presenilina 1 e 2 rilevabili nelle cellule della glia [93]. Il fenomeno sembrerebbe non derivare dall'attività macrofagica, ma da un aumento dell'espressione endogena della glia attivata. Tale considerazione è avvalorata dalla presenza di frammenti N-terminali di entrambe le preseniline nella microglia, mentre gli astrociti risultano positivi solo verso gli anticorpi specifici contro la sequenza aminoacidica del loop idrofilico della presenilina 1.

Il ruolo effettivo svolto dalle preseniline negli eventi ipossico-ischemici deve essere ulteriormente approfondito considerando anche i risultati che indicano un aumento dell'espressione di PS1 nei neuroni resistenti all'ischemia focale dello strato CA3 e del giro dentato, indotta nel sistema nervoso centrale del gerbillo della Mongolia [94].

In conclusione mentre numerosi esperimenti sembrano suggerire un possibile coinvolgimento della presenilina 1 nei meccanismi di recupero della lesione ipossico-ischemica, la presenilina 2 potrebbe rivelarsi un possibile target per contrastare l'instaurarsi di meccanismi di morte cellulare programmata che caratterizzano l'evento ipossico-ischemico.

### NCAM (*neural cell adhesion molecule*)

La NCAM, una delle circa 160 proteine che appartengono alla super-famiglia delle immunoglobuline [95] è considerata un elemento di notevole importanza nell'ontogenesi del sistema nervoso per il suo coinvolgimento in molteplici eventi quali lo sviluppo assonale, la crescita neuritica e la fascicolazione nervosa

[96, 97]. La sequenza aminoacidica della NCAM è codificata da un unico gene del quale sono note tre isoforme principali, ottenute per *splicing* alternativo (NCAM 180, 140 e 120) [98]. Tutte le isoforme sono caratterizzate dalla presenza di cinque domini Ig-simili e due fibronectina di tipo III, mentre, soltanto l'isoforma 120 risulta priva del dominio trans-membrana pur rimanendo legata alla membrana plasmatica mediante un ponte glicosilico con un fosfatidilinositolo [99]. Le interazioni cellula-cellula mediate dalla proteina possono essere di tipo omofilico od eterofilico; nelle prime i legami inter-cellulari vengono stabiliti tra due molecole di NCAM; nelle altre il partner è costituito da numerose proteine tra le quali sono state identificate la L1 [100], la TAG-1/axonina 1 [101] ed il recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFr) [102].

La variabilità della proteina di adesione neurale viene ulteriormente incrementata da modificazioni post-traduzionali [103]. In particolare, due siti di N-glicosilazione posti nel quinto dominio Ig-simile [104] sono considerati estremamente interessanti in quanto costituiscono il sito di legame d'elezione per l'acido polisialico [105], un omopolimero  $\alpha$  2-8 dell'acido N-acetilneuroaminico [106]. Le catene di tale acido conferiscono alcune caratteristiche peculiari alla PSA-NCAM per l'ingombro sterico e la carica elettrica negativa di cui sono dotate. Quella che viene definita la forma embrionale della NCAM [107], infatti, rispetto alle forme non polisialicate, risulta caratterizzata da una maggiore dinamica nell'interazione cellula-cellula e cellula-matrice, particolarmente utile durante l'ontogenesi quando, per assecondare le trasformazioni morfologiche dello sviluppo sono necessari legami facilmente modificabili. La forma embrionale della NCAM rimane espressa nel cervello adulto in alcune aree ben circoscritte come la neuroipofisi [108], i bulbi olfattivi [109], la retina [110] e nei neuroni dello strato delle cellule granulari dell'ippocampo [111]. Questi distretti del sistema nervoso centrale mantengono la capacità di effettuare cambiamenti strutturali e funzionali anche in età adulta, conservando una intrinseca attività neuroplastica. L'espressione della PSA-NCAM è incrementata nei neuroni e nelle cellule gliali in risposta ai fenomeni di plasticità sinaptica alla base dell'apprendimento [112] e del consolidamento mnemonico [113] e nel corso del rimodellamento neurale prodotto da alcune tipologie di trauma cerebrale. Esperimenti di lesione condotti sulla corteccia entorinale [114] hanno permesso di individuare, dopo quindici ore dalla resezione degli assoni corticali, un aumento della concentrazione della forma embrionale della NCAM nel citoplasma dei dendriti neuronali dello strato granulare che attraversano lo strato molecolare interno nell'ippocampo. Dopo quarantotto ore l'immunoreattività prodotta dalle nuove proteine si trasferisce nello strato molecolare esterno cui afferiscono i dendriti. In quest'ultima area in seguito alla lesione, in circa due giorni, si verifica la perdita dell'85% delle

sinapsi [115]. Dopo trenta giorni la PSA-NCAM è ancora sovra-espressa sulle membrane plasmatiche delle afferenze dello strato molecolare esterno, mentre la densità sinaptica della regione ha recuperato il cinquanta per cento del valore iniziale [116].

Esperimenti di ischemia globale condotti sul gerbillo della Mongolia hanno evidenziato un moderato incremento dopo 1-2 giorni della proteina polisialilata nelle cellule dello strato granulare dell'ippocampo [117]. In particolare, a partire dal quinto giorno post-trauma, l'immunoreattività verso la NCAM diminuisce in modo significativo nei neuroni, mentre l'astroglia dei processi radiali, presenta ancora sovra-espressione, dopo 35 giorni dal trauma ischemico.

Il significato dell'aumento delle forme 120/140 della NCAM, caratteristiche della glia, dopo l'ipossia-ischemia, non è ancora stato compreso in modo esaustivo, anche se esistono alcune evidenze di un suo coinvolgimento nel supporto alla crescita assonale [118].

## Conclusioni

La risposta cerebrale all'ischemia è data dal bilanciamento tra l'attivazione di meccanismi neuroprotettivi endogeni e cambiamenti neurodistruttivi che aumentano la probabilità della morte cellulare. Tali processi contrapposti sono ulteriormente influenzati dalla regolazione dell'espressione genica. D'altra parte l'aumentato livello di alcune proteine, può limitare la perdita cellulare oltre ad attivare un meccanismo di riparo che influisce sul recupero del danno subito da parte del cervello.

Il danno ipossico ischemico favorisce, come dimostrato dagli esempi dei vari marcatori proteici passati in rassegna, una modificazione dell'espressione quantitativa e funzionale delle proteine coinvolte. Da una parte si osserva la produzione selettiva di particolari isoforme come nel caso dell'APP (APP<sub>751</sub>) e della PS2, dall'altra l'induzione di modificazioni post-traduzionali che ne cambiano l'attività (fosforilazione della sinapsina I e polisialilazione della N-CAM), adattandola alle nuove necessità di recupero funzionale e strutturale del tessuto danneggiato.

L'ipossia-ischemia perinatale presenta ancora alcuni meccanismi che non sono stati messi in luce in maniera adeguata. Quello che emerge dalla lettura critica delle evidenze riportate è una sostanziale carenza di informazioni sull'attività delle proteine esaminate che sono state quasi esclusivamente studiate sperimentalmente nell'adulto. I meccanismi biomolecolari di degenerazione neuronale e recupero funzionale nei due processi potrebbero però non differire in maniera sostanziale ed anzi nell'adulto, in seguito alla lesione ipossico-ischemica si è da più parti osservata una regressione del tessuto nervoso ad uno stadio parzialmente simile a quello embrionale. In definitiva

l'ipotesi che le proteine attive durante l'ontogenesi conservino un ruolo nella fase successiva al danno ipossico-ischemico potrebbe rivelarsi tanto più vera nel caso dell'ipossia perinatale.

In conclusione i processi coinvolti nel cambiamento di espressione delle proteine associate alla plasticità sinaptica, necessitano attualmente di una maggiore comprensione, perché il loro studio potrebbe fornire una preziosa chiave di lettura per aumentare le informazioni disponibili sia sulle funzioni fisiologiche svolte dalle stesse proteine, talvolta ancora ignote, sia sulla regolazione sistemica di un evento necessariamente complesso quale il recupero della funzionalità del tessuto nervoso.

#### Ringraziamenti

Questo contributo è stato realizzato nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata dell'Istituto Superiore di Sanità "Danno cerebrale ipossico/ischemico nel neonato: studi epidemiologici e sperimentali su diagnosi, terapie e recupero".

Lavoro presentato su invito.

Accettato il 19 luglio 2001.

#### BIBLIOGRAFIA

- Lutz PL, Nilsson GE, Perez-Pinzon MA. Anoxia tolerant animals from a neurobiological perspectives. *Comp Biochem Physiol* 1996;113B:3-13.
- Du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol* 1997;24:627-54.
- Vannucci RC, Perlman JM. Intervention for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-14.
- Singer D. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. *Comp Biochem Physiol* 1999;123:221-34.
- King TA, Jackson GL, Josey AS. The effect of profound umbilical artery acidemia in term neonates admitted to a newborn nursery. *J Pediatr* 1998;132:624-9.
- Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, Nadler JV. Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 1988;27:387-402.
- Ito U, Spatz M, Walker JT, Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. *Acta Neuropathol* 1975;32:209-23.
- Kirino T. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1984;62:201-8.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 1991;40:599-636.
- Johansen FF, Zimmer J, Dimer MH. Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA-1 pyramidal cell loss. *Acta Neuropathol* 1987;79:110-4.
- Dessi F, Colle MA, Hauw JJ, Duyckaerts C. Accumulation of SNAP-25 immunoreactive material in axons of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1997;8(17):3685-9.
- Mukaetova-Ladinska EB, Garcia-Siera F, Hurt J, Gertz HJ, Xuereb JH, Hills R, Brayne C *et al.* Staging of cytoskeletal and beta amyloid changes in human isocortex reveals biphasic synaptic protein response during progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2000;157(2):623-36.
- Sokolov BP, Tcherepanov AA, Haroutunian V, Davis KL. Levels of mRNAs encoding synaptic vesicle and synaptic plasma membrane proteins in the temporal cortex of elderly schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 2000;1;48(3):184-96.
- Marti E, Ferrer I, Ballabriga J, Blasi J. Increase in SNAP-25 immunoreactivity in the mossy fibers following transient forebrain ischemia in the gerbil *Acta Neuropathol* 1998;95:254-60.
- Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battemberg ML, Billingsley M, Bloom FE, Wilson WC. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 1989;109:3039-52.
- Geddes JW, Hess EJ, Hart RA, Kesslak JP, Cotman CW, Wilson MC. Lesion of hippocampal circuitry define synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) as a novel presynaptic marker. *Neuroscience* 1990;38:515-25.
- Schmidt-Kastner R, Bedard A, Hakim A. Transient expression of GAP-43 within the hippocampus after global brain ischemia in rat. *Cell Tiss Res* 1997;288:225-38.
- Tagaya M, Matsuyama T, Nakamura H, Hata R, Shimizu S, Kiyama H, Matsumoto M, Sugita M. Increased F1/GAP-43 mRNA accumulation in the gerbil hippocampus after brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:1132-5.
- Moretto MB, de Mattos-Dutra A, Arteni N, Meirelles R, Sampaio de Freitas M, Netto AC, Pessoa-Pureur R. Effects of neonatal cerebral hypoxia-ischemia on the *in vitro* phosphorylation of Synapsin I in rat synaptosomes. *Neurochem Res* 1999;24(10):1263-9.
- Petrucci T, Macione P, Paggi P. Axonal transport kinetics and posttranslational modification of synapsin I in mouse retinal ganglion cells. *J Neurosci* 1991;11(9):2938-46.
- Harada A, Sobue K, Hirokawa N. Developmental changes of synapsin I subcellular localization in rat cerebellar neurons. *Cell Struct Funct* 1990;15:329-42.
- Hirokawa N, Sobue Kanda K, Harada A, Yorifuji H. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J Cell Biol* 1989;108:111-26.
- Hirokawa N. Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton. In: Burgoyne RD (Ed.). *The neuronal cytoskeleton*. New York: Wiley-Liss; 1990. p. 5-74.
- Marti E, Ferrer I, Blasi J. Transient increase of synapsin-I immunoreactivity in the mossy fiber layer of the hippocampus after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Brain Res* 1999;824:153-60.
- Melloni RH, De Gennaro LJ. Temporal onset of synapsin-I gene expression coincides with neuronal differentiation during the development of the nervous system. *J Comp Neurol* 1994;342:449-62.



26. Kitagawa K, Matsumoto M, Sobue K, Tagaya M, Okabe T, Niinobe M, Ohtsuki T *et al.* The synapsin I brain distribution in ischemia. *Neuroscience* 1992;46:287-99.
27. Grosse G, Grosse J, Tapp R, Kuchinke J, Gorsleben M, Fetter I, Hönhe Tapp R *et al.* SNAP 25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 1999;56:539-46.
28. Osen-Sand A, Catsicas M, Staple JK, Jones KA, Ayala G, Knowles J, Grenningloh G *et al.* Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 1993;364:445-8.
29. Roberts AL, Morris BJ, O'Schaughnessy TC. Involvement of two isoforms of SNAP-25 in the expression of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Molec Neurosci* 1998;9:33-6.
30. Onodera H, Aoki H, Yae T, Kogure K. Post-ischemic plasticity in the rat hippocampus after long-term survival: histochemical and autoradiographic study. *Neuroscience* 1990;38:125-36.
31. Benowitz LI, Routtenberg A. A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1987;10:527-32.
32. Skene H. Axonal growth-associated proteins. *Ann Rev Neurosci* 1989;12:127-56.
33. Lovinger DM, Colley PA, Akers RF, Nelson RB, Routtenberg A. Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. *Brain Res* 1986;399:205-11.
34. Cimler BM, Giebelhaus DH, Wakim BT, Storm DR, Moon RT. Characterization of murine cDNAs encoding P57, a neural-specific calmodulin-binding protein. *J Biol Chem* 1987;262:12158-63.
35. Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *TINS* 1997;2:84-91.
36. Strittmatter S, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 1990;344: 836-41.
37. Strittmatter S, Valenzuela D, Vartanian D, Sudo Y, Zuber M, Fishman MC. Growth cone transduction: G0 and GAP-43. *J Cell Sci* 1991;15:27-33.
38. Strittmatter S, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC. Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell* 1995;80:445-52.
39. Aigner L, Arber S, Kapfhammer J, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR *et al.* Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system in transgenic mice. *Cell* 1995;83:269-78.
40. Figueiredo BC, Skup M, Bedard AM, Tetzlaff W, Cuello AC. Differential expression of p140trk, p75 and growth-associated phosphoprotein-43 genes in nucleus basalis magnocellularis, thalamus and adjacent cortex following meocortical unarction and nerve growth factor treatment. *Neuroscience* 1995;98(1): 29-45.
41. Li Y, Jiang N, Powers C, Chopp M. Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1998;29:1972-81.
42. Wiche G. High-M<sub>r</sub> microtubule-associated proteins: properties and functions. *Biochem J* 1989;259:1-12.
43. Caceres A, Binder LI, Payne MR, Bender P, Rebhuhn L, Steward O. Differential subcellular localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 1984;11:819-46.
44. Bernhardt R, Matus A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeleton. *J Comparative Neurol* 1984;226:203-21.
45. De Camilli P, Miller P, Navone F, Theurkauf W, Vallee R. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 1984;11:819-46.
46. Matus A. Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci* 1994;17:19-22.
47. Theurkauf W, Vallee R. Phosphorylation of MAP2 by c AMP-independent protein kinase. *J Cell Biol* 1982;95:340a.
48. Vallee R. Structure and phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2). *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77: 3206-10.
49. Yamauchi T, Fujisawa H. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 by calmodulin dependent protein kinase (kinase II) which occurs only in the brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;109:975-81.
50. Inuzuka T, Tamura A, Sato S, Kirino T, Yanagisawa K, Toyoshima I, Miyatake T. Changes in the concentration of cerebral proteins following occlusion in the middle cerebral artery in rats. *Stroke* 1990;21:917-22.
51. Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N *et al.* Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage. Immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* 1989;31:401-11.
52. Kudo T, Tada K, Takeda M, Nishimura T. Learning impairment and microtubule-associated protein 2 decrease in gerbils under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 1990;21:1205-9.
53. Miyazawa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. Temperature effect of immunostaining of microtubule-associated protein 2 and synaptophysin after 30 minutes of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1993;85:526-32.
54. Rae A, Gilland E, Bona E, Hagberg H. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Dev Brain Res* 1995;84:245-52.
55. Dawson DA, Hallenbeck JM. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assesment of acute brain injury. *J Cerebral Blood Flow Metab* 1996;16:170-4.
56. Johnston M. Neurotransmitters alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 1983;13:511-8.
57. Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurochemistry* 2000;75(2):819-9.

58. Kirino T, Tamura A, Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog Brain Res* 1985;63:39-58.
59. Abe K, Tanzi RE, Kogure K. Selective induction of Kunitz-type protease inhibitor domain-containing amyloid precursor protein mRNA after persistent focal ischemia in rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 1991;125(2):172-4.
60. Abe K, Kogure K. Selective gene expression after brain ischemia. *Prog Brain Res* 1993;96:221-36.
61. Lyckman AW, Confaloni AM, Thinakaran G, Sisodia SS, Moya KL. Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor proteins in the central nervous system. *J Biol Chem* 1998;273(18):111000.
62. Koistinaho J, Pyykonen I, Keinänen R, Hokfelt T. Expression of b-amyloid precursor protein mRNAs following transient focal ischaemia. *Clin Neurosci Neuropathol* 1996;7:2727-31.
63. Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Craddock SD, Culwell AR, Rydel RE, Mattson MP. Secreted forms of  $\beta$ -amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J Neurochem* 1994; 63:781-4.
64. Fukuchi KI, Kamino K, Deeb SS, Smith AC, Dang T, Martin GM. Overexpression of amyloid precursor protein alters its normal processing and is associated with neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:165-73.
65. Yhoshikawa K, Aizawa T, Hayashi Y. Degeneration *in vitro* of post-mitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature* 1992;359:64-7.
66. Cosgaya JM, Latasa MJ, Pascual A. Nerve growth factor and ras regulate beta-amyloid precursor protein gene expression in PC12 cells. *Neurochem* 1996;67:98-104.
67. Fukuchi KI, Ohman T, Dang N, Smith AC, Furlong CE, Martin GM. Overexpressions of c-DNAs for beta-amyloid precursor proteins 695, 751 and 770 enhance the secretion of beta-amyloid precursor protein derivatives and the survival of P19-derived neurons. *J Neurochem* 1996;66:165-73.
68. Baiden-Amisshah K, Joashi U, Blumberg R, Mehmet H, Edwards AD, Cox PM. Expression of amyloid precursor b-protein (b-APP) in the neonatal brain following hypoxic ischaemic injury. *Neuropath App Neurobiol* 1998;24:346-52.
69. Masliah E, Westland CE, Rockenstein EM, Abraham CR, Mallory M, Veinberg I, Scheldon E *et al.* Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries *in vivo*. *Neuroscience* 1997;78:135-46.
70. Palacios G, Mengod G, Tortosa A, Ferrer I, Palacios M. Increased b-amyloid precursor expression in astrocytes in the gerbil hippocampus following ischaemia: association with proliferation of astrocytes. *Eur J Neurosci* 1995;7:501-10.
71. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Chi H *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer's Disease. *Nature* 1995;375:754-60.
72. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H *et al.* Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995;376:775-8.
73. Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T *et al.* Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vitro*. *Neuron* 1996; 17: 181-90.
74. Kim TW, Pettingell WH, Hallmark OG, Moir RD, Wasco W, Tanzi RE. Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem* 1997;272:11006-10.
75. Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD *et al.* Alzheimer-associated pre-senilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Med* 1996;2:224-9.
76. De Strooper B, Beullens M, Contreras B, Levesque L, Craessaerts K, Cordell B, Moechars D *et al.* Phosphorylation, subcellular localisation, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 1997;272:3590-8.
77. Dewji NN, Singer SJ. Specific intercellular binding of the b-amyloid precursor protein to the presenilins induces intercellular signaling: its significance for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15055-60.
78. Ribaut-Barassin C, Moussaoui S, Brugg B, Haeblerlè A-M, Huber G, Imperato A, Delhay-Bouchaud N *et al.* Hemisynaptic distribution patterns of the presenilins and b-APP isoforms in the rodent cerebellum and hippocampus. *Synapse* 2000;35:96-110.
79. Suzuki T, Nishiyama K, Murayama S, Yamamoto A, Sato S, Kanazawa I, Sakaki Y. Regional and cellular presenilin 1 gene expression in human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:708-13.
80. Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D, George-Hyslop PS *et al.* Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 1999; 147:277-94.
81. Levitan D, Doyle TG, Brousseau D, Lee MK, Thinakaran G, Slunt HH, Sisodia SS *et al.* Assessment of normal and mutant presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14940-4.
82. Guo G, Sopher BL, Pham DG, Furukawa K, Robinson N, Martin GM, Mattson MP. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 1997;17:4212-22.
83. Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B *et al.* Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 1996;274:1710-3.
84. Berezovska O, Xia MQ, Page K, Wasco W, Tanzi RE, Hyman BT. Developmental regulation of presenilin mRNA expression parallels Notch expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56: 40-4.
85. Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsingji DJS, Trumbauer ME, Chen HY, Price DL, Van Der Ploeg LHT, Sisodia S. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 1997;387:288-92.
86. Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonogawa S. Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice. *Cell* 1997;89:629-39.

87. Moreno-Flores MT, Medina M, Wandosell F. Expression of presenilin 1 in nervous system during rat development. *J Comp Neurol* 1999;410:556-70.
88. Grilli M, Diodato E, Lozza G, Brusa R, Cesarini M, Uberti D, Rozmahel R *et al.* Presenilin 1 regulates the neuronal threshold to excitotoxicity both physiologically and pathologically. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;23:12822-7.
89. Mattson MP, Zhu H, Yu J, Kindy MS. Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia *in vivo* and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis. *J Neurosci* 2000;20:1358-64.
90. Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann NY Acad Sci* 1999;893:154-75.
91. Lukiw WJ, Gordon WC, Rogaev EI, Thompson H, Bazan NG. Presenilin-2 (PS2) expression up-regulation in a model of retinopathy of prematurity and pathoangiogenesis. *Neuroreport* 2001;12:53-7.
92. Sato N, Hori O, Yamaguchi A, Lambert J-C, Chartier-Harlin M-C, Robinson PA, Delacourte A *et al.* A novel presenilin-2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue. *J Neurochem* 1999;72:2498-505.
93. Miake H, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Levesque L, Fraser PE, St. George-Hyslop PH *et al.* Glial expression of presenilin epitopes in human brain with cerebral infarction and in astrocytoma. *Acta Neuropathol* 1999;98:337-40.
94. Tanimukai H, Imaizumi K, Kudo T, Katayama T, Tsuda M, Takagi T, Tohyama M *et al.* Alzheimer-associated presenilin-1 gene is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia. *Mol Brain Res* 1998;54:212-8.
95. Brummendorf T, Rathjen FG. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein profile* 1995;2:963-1008.
96. Edelman G. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu Rev Cell Biol* 1986;2:81-116.
97. Rutishauser U, Acheson A, Hall A, Sunshine J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988;240:53-7.
98. Owens GC, Edelman GM, Cunningham BA. Organization of the N-CAM gene - alternative exon usage as the basis for different membrane associated domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:294-8.
99. Rønn LCB, Pedersen N, Jahnsen H, Berezin V, Bock E. Brain plasticity and the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Adv Exp Med Biol* 1997;429:305-22.
100. Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 1990;110:193-208.
101. Milev P, Maurel P, Haring M, Margolis RK, Margolis RU. TAG-1/axonin 1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphocan/protein-tyrosinephosphatase-zeta/beta and NCAM. *J Biol Chem* 1996;271:15716-23.
102. Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, NCAM, and N-cadherin. *Neuron* 1994;13:583-94.
103. Krog L, Bock E. Glycosylation of neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *APMIS Supplementum* 1992;27:53-70.
104. Nelson RW, Bates PA, Rutishauser U. Protein determination for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 1995;270:17171-9.
105. Zuber C, Lackie PM, Catterall WA, Roth J. Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem* 1992;267:9965-71.
106. Rougon G. Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol* 1993;61:197-207.
107. Edelman GM, Chuong C. Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7036-40.
108. Kiss JZ, Wang C, Rougon G. Nerve-dependent expression of high polysialic acid neural cell adhesion molecule in neurohypophysial astrocytes of adult rats. *Neuroscience* 1993;53:213-21.
109. Miragall LS, Kadmon G, Husmann M, Schachner M. Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult mouse: presence of embryonic form of N-CAM. *Dev Biol* 1988;129:516-31.
110. Bartsch U, Kirchhoff F, Schachner M. Highly sialylated N-CAM is expressed in adult mouse optic nerve and retina. *J Neurocytol* 1990;19:550-65.
111. Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 1993;13:2351-8.
112. O'Connell AW, Fox GB, Barry T, Foley AG, Murphy KJ, Fichera G, Kelly J, Regan GM. Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem* 1997;68(6):2538-46.
113. Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M. The polysialic acid modification of neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 1996;45:143-52.
114. Styren SD, Lagenaur CF, Miller PD, Dekosky ST. Rapid expression and transport of embryonic N-CAM in dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: ultrastructural analysis. *J Comp Neurol* 1994;349:486-92.
115. Scheff SW. Neural regeneration and transplantation. In: Seil FJ (Ed.). *Synaptic reorganization after injury: the hippocampus as a model system*. New York: Liss; 1989. p. 137-56.
116. Jucker M, Mondadori C, Mohajeri H, Bartsch U, Schachner M. Transient upregulation of NCAM mRNA in astrocytes in response to entorhinal cortex lesions and ischemia. *Mol Brain Res* 1995;28:149-56.
117. Fox GB, Kjoller C, Murphy KJ, Regan CM. The modulation of NCAM polysialylation state that follow transient global ischemia are brief on neurons but enduring. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60(2):132-40.
118. Kawaja MD, Gage FH. Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. *Neuron* 1991;7:1019-30.