

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA



DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE MEDICHE

**TESI DI DOTTORATO IN GENETICA E MEDICINA
MOLECOLARE – XVII CICLO**

**STUDIO DELLA REGOLAZIONE DELLA
MATURAZIONE PROTEOLITICA DEL PRECURSORE
DEL PEPTIDE β AMILOIDE APP**

Supervisore

Prof. Tommaso Russo

Candidato

Dott. Davide Gianni

Coordinatore del Corso

Prof. Carmelo Bruno Bruni

| | |
|--|-----------|
| INTRODUZIONE | 3 |
| LE BASI MOLECOLARI DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER..... | 4 |
| IL PRECURSORE DEL PEPTIDE B-AMILOIDE, APP, E LA SUA MATURAZIONE PROTEOLITICA | 6 |
| LE ATTIVITA' ENZIMATICHE COINVOLTE NELLA MATURAZIONE PROTEOLITICA DI APP | 8 |
| LE POSSIBILI FUNZIONI DI APP | 11 |
| L'ADATTATORE MOLECOLARE Fe65 ED I SUOI LIGANDI..... | 14 |
| IL FATTORE DI CRESCITA DERIVANTE DALLE PIASTRINE PDGF E LE MOLECOLE CHE NE TRADUCONO IL SEGNALE | 16 |
| OBIETTIVI DELLA TESI | 18 |
| MATERIALI E METODI..... | 19 |
| GENERAZIONE DEI VETTORI DI ESPRESSIONE APP-GAL4..... | 20 |
| COLTURE CELLULARI E GENERAZIONE DEI CLONI DI CELLULE HELaAG | 23 |
| TRASFEZIONI E TRATTAMENTI FARMACOLOGICI | 24 |
| PURIFICAZIONE DELL'ATTIVITA' CHE INDUCE IL TAGLIO DI APP-GAL4..... | 25 |
| PREPARAZIONE DI ESTRATTI CELLULARI E WESTERN BLOTTING | 26 |
| SAGGI REPORTER..... | 27 |
| RISULTATI..... | 28 |
| IL MEZZO CONDIZIONATO DELLE C6 POSSIEDE UN'ATTIVITA' CHE INDUCE L'ACCUMULO DI CAT IN CELLULE HELa STABILMENTE ESPRIMENTI LA PROTEINA DI FUSIONE APP-GAL4..... | 29 |
| PURIFICAZIONE DAL MEZZO CONDIZIONATO DELLE C6 DELL'ATTIVITA' CHE INDUCE IL TAGLIO DI APP-GAL4 | 30 |
| IL PDGF INDUCE UN ACCUMULO DI CAT IN CELLULE HELaAG ATTRAVERSO L'ATTIVAZIONE DEL SUO STESSO RECETTORE. | 31 |
| L'AUMENTO DELLA CONCENTRAZIONE DI CAT IN CELLULE HELaAG TRATTATE CON PDGF E' DOVUTO SPECIFICAMENTE AL GAL4 RILASCIATO DOPO IL TAGLIO DI APP-GAL4 | 32 |
| IL PDGF INDUCE IL TAGLIO PROTEOLITICO DI APP-GAL4 NELLE HELaAG IN MANIERA DIPENDENTE DALLE TIROSIN CHINASI NON RECETTORIALI SRC E RAC. | 33 |
| L'ACCUMULO DI CAT NELLE CELLULE HELaAG TRATTATE CON PDGF OPPURE TRASFETTATE CON SRC O CON RAC DIPENDE DALL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA Γ SECRETASI. | 34 |
| IL PDGF INDUCE LA GENERAZIONE DI AB A PARTIRE DA APP SELVATICO ATTRAVERSO UN MECCANISMO DIPENDENTE DA SRC. | 35 |
| IL DOMINIO CITOSOLICO DI APP E NON IL SUO DOMINIO EXTRACELLULARE E' NECESSARIO PER IL TAGLIO PROTEOLITICO DI APP-GAL4 INDOTTO DAL PDGF..... | 36 |
| IL PDGF ATTIVA SPECIFICAMENTE IL TAGLIO PROTEOLITICO DI APP DIPENDE DA Γ SECRETASI MENTRE NON HA NESSUN EFFETTO SUL TAGLIO Γ SECRETASICO DI NOTCH..... | 37 |
| I LIGANDI DEL DOMINIO CITOSOLICO DI APP HANNO UN EFFETTO SUL TAGLIO DI APP-GAL4 INDOTTO DAL PDGF | 38 |
| ENTRAMBE LE ISOFORME DI Fe65, Fe65L1 E Fe65L2, SONO IN GRADO DI INDURRE UN SIGNIFICATIVO ACCUMULO DI CAT NELLE HELaAG..... | 39 |
| IL DOMINIO PTB2 DI Fe65 E' NECESSARIO E SUFFICIENTE PER INDURRE UN ACCUMULO DI CAT NELLE HELaAG | 40 |
| Fe65 INDUCE IL TAGLIO DI APP-GAL4 ATTRAVERSO UN MECCANISMO DIVERSO DA QUELLO INDOTTO DAL PDGF | 41 |
| IL TAGLIO DI APP GAL4 INDOTTO DA Fe65 E' INDIPENDENTE DALL'ATTIVITA' DELLA Γ SECRETASI, MENTRE E' DIPENDENTE DALL'ATTIVITA' DELLA CASPASI 3..... | 42 |
| SHC INDUCE IL TAGLIO DI APP-GAL4 NELLE HELa AG IN MANIERA Γ SECRETASICA DIPENDENTE, COME IL PDGF, AGENDO NEL SUO STESSO PATHWAY, ED IN MODO INDIPENDENTE DALL'ATTIVITA' DELLA CASPASI 3 | 43 |
| DISCUSSIONE..... | 44 |
| RINGRAZIAMENTI | 47 |
| LEGENDE FIGURE..... | 49 |
| BIBLIOGRAFIA | 68 |
| PUBBLICAZIONI..... | 83 |

INTRODUZIONE

Le basi molecolari della malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è un disordine neurodegenerativo eterogeneo con progressione irreversibile che interessa primariamente le regioni ippocampali e neocorticali del cervello. Questa malattia fu descritta per la prima volta nel 1907 dal neuropsichiatra tedesco Alois Alzheimer, a quei tempi la malattia era poco conosciuta, ma nel corso degli anni il numero dei casi diagnosticati è notevolmente aumentato ed oggi colpisce circa il 2% della popolazione dei paesi industrializzati.

L'incidenza della malattia di Alzheimer aumenta con l'età e, con l'allungamento della vita umana media, questa malattia sta diventando uno dei maggiori problemi sanitari legato all'invecchiamento della popolazione mondiale. Non esiste al momento alcuna cura efficace contro di essa e la patogenesi della malattia resta ancora oggetto di molte teorie che coinvolgono fattori genetici ed epigenetici (come fattori metabolici od ambientali).

Clinicamente, la malattia è caratterizzata da una perdita di memoria e delle sinapsi, seguita da un progressivo deterioramento di tutte le funzioni mentali e cognitive, risultando alla fine nella demenza. Nei soggetti affetti dalla malattia si osservano due tipi di depositi caratteristici, le placche amiloidi extracellulari e gli aggregati intracellulari neurofibrillari (Dickson, 1997). Questi due marcatori neuropatologici derivano entrambi dall'accumulo aberrante di normali proteine cellulari, con conseguente deposito di materiale insolubile, che interferisce con le normali funzioni neuronali, e con la plasticità sinaptica. Gli aggregati neurofibrillari sono ammassi intracellulari consistenti di filamenti elicoidali appaiati (PHF) di 10nm di spessore. Il maggior componente di questi filamenti è la forma iperfosforilata della proteina Tau, una proteina che lega i microtubuli. Quando Tau è iperfosforilata, diminuisce la sua capacità di legare i microtubuli e aggrega quindi in maniera anomala determinando la formazione dei PHF (Patrick et al., 1999, Terry et al., 1987). L'aggregazione di Tau in filamenti porta al collasso dei microtubuli ed ad una riduzione del trasporto assonale, fondamentale nel trasferimento di sostanze di natura trofica ed energetica tra corpo cellulare e sinapsi. L'efficienza di questo trasporto è necessaria per mantenere buone connessioni neuronali; quando il trasporto viene alterato i neuroni degenerano e la rete neuronale coinvolta nelle varie funzioni cognitive e vitali viene interrotta, provocando i sintomi tipici della malattia di Alzheimer.

Il maggior costituente delle placche amiloidi è stato purificato e sequenziato nel 1984 da Gorge Glenner: è un polipeptide di 40-42 aa chiamato da Glenner stesso "β amiloide" o "Aβ", derivante dalla proteolisi della proteina di membrana conosciuta come proteina precursore dell'amiloide (APP) (Kang et al., 1987). Il peptide β amiloide nelle placche è organizzato in fibrille di 7-10 nm di spessore intramezzate con forme non fibrillari. Le placche mature inoltre contengono assoni e dendriti degenerati e sono circondate da astrociti reattivi e cellule della microglia, indicando quindi che c'è una componente infiammatoria nel processo neurodegenerativo (Lemere et al., 1996; Dodart et al., 2002).

Un'ipotesi molto valida, che ha ricevuto molto successo, per cercare di spiegare cosa provoca il processo di degenerazione neurofibrillare e la perdita di sinapsi, tipica

dell'AD, e' la variante neuroinfiammatoria dell'ipotesi della cascata dell'amiloide (Hardy and Selkoe, 2002): secondo questa ipotesi, formulata qualche anno fa, $A\beta$ e' responsabile indirettamente della fosforilazione di Tau e della conseguente degenerazione neurofibrillare, attraverso l'attivazione della microglia; in pratica, l' $A\beta$ depositato nelle placche funge da stimolo infiammatorio cronico, attivando le cellule della microglia e determinando la produzione di sostanze neurotossiche, come radicali liberi, citochine proinfiammatorie, mediatori dell'infiammazione e proteine del complemento, responsabili in ultima analisi della morte neuronale e della demenza.

Esistono forme sporadiche (circa il 90% dei casi) e familiari (FAD) di AD che, sebbene differiscano per l'età di insorgenza, in genere anticipata nelle forme familiari (prima dei 65 anni), hanno durata e manifestazioni patologiche simili (St George-Hyslop 2000).

La patogenesi dell'AD e' complessa e dipende sia da fattori genetici che ambientali. Sebbene la maggior parte dei casi sporadici della malattia abbia un'eziologia ignota, le forme familiari (FAD) di AD possono essere chiaramente e direttamente collegate a 3 loci genetici, le cui mutazioni inducono la malattia: il locus della proteina precursore del peptide β -amiloide, APP, ed i loci di due geni che codificano per le preseniline, PS1 e PS2, che fanno parte del complesso enzimatico che porta alla generazione del peptide amiloide. Tutte le mutazioni a carico di APP finora conosciute portano ad un aumento nella produzione del peptide β -amiloide, in particolare della sua isoforma più lunga, quella costituita da 42 aminoacidi ($A\beta_{42}$) e che, rispetto alla variante di 40 residui, è più neurotossica per la sua maggiore tendenza ad aggregare (Gandy and Petanceska, 2000). E' stato dimostrato che anche le mutazioni a carico delle preseniline portano ad un aumento della produzione di $A\beta_{42}$ (Scheuner et al., 1996). I casi di malattia di Alzheimer sporadici sono associati a polimorfismi genici che si comportano come fattori di rischio: tra questi un ruolo chiave è svolto dal locus del gene dell' Apolipoproteina E, ed in particolare dall'allele ϵ -4. L'Apolipoproteina E è una molecola coinvolta nel trasporto del colesterolo, di cui si conoscono tre isoforme, codificate dagli alleli ϵ -2, ϵ -3, ϵ -4. E' stato dimostrato che chi eredita l'allele ϵ -4 ApoE4 ha una maggiore predisposizione a sviluppare l'Alzheimer, e che l'età dell'insorgenza della malattia è anticipata rispetto ai soggetti che presentano gli altri alleli (Meyer et al., 1998). C'è, poi, una lunga lista di geni possibili fattori di rischio, il cui ruolo va confermato su casistiche più vaste; tra gli altri sono stati proposti il locus di LSF (Lambert et al., 2000), codificante per un fattore trascrizionale, ed un altro locus localizzato sul cromosoma 10, ma il cui gene non è stato ancora identificato (Bertram et al., 2000). E' stata identificata, inoltre, una variante allelica nel gene che codifica per la proteina Fe65 che protegge dalla malattia. Questa proteina, come vedremo in seguito, lega il precursore del peptide β -amiloide, e sembra che l'isoforma protettiva interagisca con minore affinità (Hu et al., 2002; Hu et al., 1998).

Il precursore del peptide β -amiloide, APP, e la sua maturazione proteolitica

La purificazione ed il sequenziamento di $A\beta$ dalle placche amiloidi presenti in casi di AD e di sindrome di Down e l'osservazione che $A\beta$ derivasse dalla maturazione proteolitica di una proteina molto piú grande detta APP, precursore del peptide β amiloide, hanno portato all'identificazione ed al clonaggio del gene di APP.

Il gene di APP è localizzato sul cromosoma 21 (Kitaguchi et al., 1988) e ciò dà ragione del fatto che nella sindrome di Down, caratterizzata dalla trisomia di questo cromosoma, l'eccessivo dosaggio genico porta all'aumentata espressione della proteina APP, che da sola è capace di indurre l'accumulo di $A\beta$ e la comparsa, dopo i 40 anni, dei segni anatomo-patologici della malattia di Alzheimer (Mann et al., 1986). La famiglia dei geni di APP di mammifero e' composta da 3 membri: APP le proteine APP-like, APLP1 e APLP2. Sono stati identificati geni omologhi in *Drosophila*, *C.elegans* e *Xenopus*. Tutti i membri della famiglia di APP sono proteine integrali di membrana di tipo I con un grosso dominio extracellulare N-terminale ed un corto dominio citosolico C-terminale. Le proteine di mammifero sono ubiquitariamente espresse. Il gene di APP contiene 19 esoni, e tra questi l'esone 7, 8 e 15 possono subire splicing alternativo, dando vita a tre diverse isoforme: APP695, APP751, APP770. L'isoforma piú corta (APP695) è espressa esclusivamente nei neuroni, mentre le altre sono ubiquitarie e contengono un dominio di inibizione delle proteasi tipo Kunitz (Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988).

Il dominio extracellulare di APP e delle proteine APLPs e' sede di modificazioni posttraduzionali che ne aumentano notevolmente la complessita' e che avvengono durante la sua maturazione nell'ER e nel Golgi; il dominio extracellulare presenta siti di O- ed N- glicosilazione, di sulfatazione, di fosforilazione, di legame di metalli (Cu^{++}) e di legame dell'eparina; inoltre lo splicing dell'esone 15 determina la formazione di un sito di legame per il condroitin-solfato-glicosaminoglicano (CS-GAG) che viene utilizzato negli astrociti ma non nei neuroni (De Strooper and Annaert, 2000; Annaert and De Strooper, 2002).

APP è substrato di tre differenti attività proteolitiche, denominate originariamente α , β e γ secretasi, in considerazione del fatto che alla loro azione consegue la liberazione di forme secrete di APP (Fig. 1) (Selkoe, 2001); APP può essere anche substrato di caspasi. Il taglio dell' α -secretasi avviene tra la Lys16 e la Leu17, all'interno della sequenza del peptide β amiloide, impedendo in tal modo la generazione dello stesso. Per questo motivo il la maturazione di APP promossa dall' α -secretasi e' stata denominata non-amiloidogena. In seguito al taglio α -secretasico, avviene il rilascio di un grande frammento ammino-terminale che include tutto il dominio extracellulare di APP (sAPP α), solubile, ed un corto frammento carbossi-terminale (C83) legato alla membrana, che include tutto il tratto transmembrana ed il corto dominio citosolico. C83 e' substrato della γ -secretasi, che genera il peptide p3 (Haass et al., 1993; Haass et al., 1992), non aggregante e non

neurotossico, ed un frammento AICD (APP intracellular domain), di 57 residui (De Strooper and Annaert, 2000; Passer et al., 2000). La forma solubile di sAPP α sembra agire come fattore autocrino (Saitoh et al., 1989), neuroprotettivo e forse anche neurotrofico (Mattson et al., 1993). Il pathway amiloidogenico prevede che la β -secretasi tagli APP all'estremità ammino-terminale del peptide A β , generando una forma solubile di APP più corta, sAPP β ed un frammento di 99 residui (C99). Tale frammento diviene substrato della γ -secretasi liberando il peptide β -amiloide ed il frammento AICD. Il taglio più importante operato dalla γ -secretasi avviene a livello della Val40, determinando la generazione di A β 40, l'isoforma di A β più abbondante. Un altro taglio 2aa più a valle, sempre operato dalla γ -secretasi, produce un frammento A β di 42 residui, detto A β 42, che rappresenta circa 10% del totale A β . Negli ultimi anni, sono stati identificati 2 altri tipi di taglio di APP: un taglio, detto γ -secretasi-like, che porta alla produzione di AICD, avviene 7aa più a valle del sito di taglio della γ -secretasi che produce A β 42 (quindi più vicino all'interfaccia membrana/citosol), ed è stato chiamato taglio ϵ , dal momento che assomiglia al taglio γ -secretasi-like di Notch-1. Il secondo tipo di taglio avviene invece a livello di un altro sito tra l'Asp664 e Ala665, a valle di quello riconosciuto dalla γ -secretasi, su cui agisce una caspasi (probabilmente caspasi-3): tale taglio porta alla produzione di un peptide di 31 amminoacidi (C31), che è neurotossico per la cellula ed è un potente attivatore apoptotico (Lu et al., 2000; Weidemann et al., 1999).

Le Attività enzimatiche coinvolte nella maturazione proteolitica di APP

Il taglio di APP operato dall' α -secretasi e' in qualche modo simile alla maturazione di altre proteine integrali di membrana, come i fattori di crescita TGF- α , TNF- α e la molecola di adesione cellulare L-selectina (Asai et al., 2003; Buxbaum et al., 1998). La maturazione di tutte queste proteine consiste di una componente costitutiva ed una componente regolata, che puo' essere attivata attraverso la protein chinasi C (PKC) ed altre cascate di secondi messaggeri. La proteasi responsabile del rilascio del TNF- α e' stata identificata nel Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE), un membro della famiglia delle metalloproteasi ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) (Saitoh et al., 1989): topi KO per TACE mostrano difetti nella maturazione proteolitica di molte proteine tra cui TGF- α , TNF- α ed L-selectina. Fibroblasti derivati da questi stessi KO mostrano anche difetti nella secrezione di α -APPs modulata da PKC, indicando quindi che TACE ha un ruolo chiave nella componente regolatoria del taglio α -secretasico di APP nei fibroblasti. Piu' recentemente altre 2 proteasi della famiglia di ADAM sono state caratterizzate, ADAM10 ed ADAM9. Esperimenti di co-trasfezione di queste 2 proteasi con APP determina un'aumentata secrezione costitutiva e regolata di α APPs, indicando quindi che entrambe le proteasi svolgono un ruolo di primo piano nel indurre il taglio α -secretasico di APP (Mattson et al., 1993).

Diversi laboratori, usando approcci indipendenti, sono arrivati all'identificazione della β -secretasi quasi contemporaneamente. L'enzima deputato a svolgere la funzione di β -secretasi e' un'aspartil-proteasi, localizzata nell'apparato del Golgi, cui e' stato dato il nome di BACE-1 (β -site APP-cleaving enzyme) (Vassar et al., 1999), il cui gene si trova sul cromosoma 11. Una seconda β -secretasi, chiamata BACE-2, mostrante il 64% di omologia con BACE-1, e' stata poi identificata mediante screening di database genomici ed il suo gene risiede sul cromosoma 21 (Hussain et al., 1999). Sebbene, come vedremo, e' stato dimostrato che BACE-1 gioca un ruolo di primo piano nella patogenesi dell'AD, non sono state trovate mutazioni o associazioni alleliche tra BACE e casi di Alzheimer sporadici o familiari. BACE-1 e' una proteina integrale di membrana di tipo I che ha un prodominio e contiene 2 motivi Dt/sGt/s nel suo dominio extracellulare (Lin et al., 2000). Questi motivi sono caratteristiche tipiche di domini catalitici di aspartil-proteasi. BACE-1 taglia APP in 2 differenti posizioni: a livello del classico sito, detto Asp1, ed a livello del Glu11, determinando la formazione di una forma piu' piccola di A β precedentemente identificata nelle placche. Entrambe le proteine BACE sono sottoposte a modificazioni posttraduzionali, includenti N-glicosilazioni complesse, fosforilazioni, formazione di ponti disolfuro, palmitoilazione e taglio di propeptide per ottenere la maturazione completa. Infatti il dominio RLPR (Arg-Leu-Pro-Arg) che affianca il pro-dominio di BACE-1 e' tagliato da una convertasi, determinando la generazione della forma matura dell'enzima (De Strooper and Annaert, 2000). E' altamente espresso nel cervello e mostra maggiore affinita' per la cosiddetta forma Swedish di APP, ossia la forma contenente la mutazione puntiforme (K595N e M596L), che e'

stata dimostrata associata a casi di FAD. BACE-1 ha un pH ottimale acido, e' localizzato prevalentemente a livello del Golgi/TGN ed e' un costituente dei lipid-rafts, che sono microdomini della membrana citoplasmatica arricchiti di sfingolipidi e colesterolo. Ci sono dati che provano che anche APP puo' far parte di questi rafts e che addirittura mostrano che l'uso delle statine, od in generale la deplezione di colesterolo, puo' drasticamente diminuire la produzione di A β in cellule in coltura (Annaert and De Strooper, 2002). Il modello che e' stato proposto e' che, in condizioni di diminuzione della concentrazione di colesterolo intracellulare, questi microdomini vengano distrutti e APP sia quindi disponibile per il taglio α -secretasico. Inizialmente si credeva che il taglio α -secretasico fosse quello fisiologico in quanto era in grado di prevenire l'amiloidogenesi dell'AD. Questa pero' e' risultata essere una semplificazione del problema, in quanto e' stato dimostrato che il peptide β -amiloide viene normalmente prodotto anche in condizioni fisiologiche, e che, solo una frazione del pool totale di APP viene processato dalle α -secretasi in diversi tipi cellulari, lasciando la maggior parte del pool cellulare di APP non processato. Inoltre il bilancio tra taglio amiloidogenico e non e' anche regolato dalla compartimentalizzazione di tali enzimi; l' α -secretasi taglia APP tipicamente a livello della membrana cellulare, mentre la β -secretasi lega APP a livello della membrana ma poi e' internalizzato con esso negli endosomi, dove in seguito all'abbassamento del pH, la sua attivita' raggiunge livelli ottimali.

La γ -secretasi e' un'attivita' che risiede in un complesso enzimatico ad alto peso molecolare costituito da quattro differenti proteine di membrana, le preseniline, nicastrina, Aph-1 e Pen-2 (De Strooper, 2003; Haass, 2004). Tale attivita' e' stata inizialmente identificata per il suo ruolo nella maturazione di APP e Notch, ma, ad oggi, sono state identificate ben 15 proteine transmembrana di tipo I ed un recettore multipasso transmembrana, bersagli di questa attivita' (APLP1 e 2, Erb4, E-caderina, LRP, CD44, p75NTR e tante altre). La γ secretasi e' una aspartil proteasi abbastanza insolita ed il suo dominio catalitico e' uno delle questioni irrisolte piu' intriganti ed affascinanti in biologia negli ultimi anni. Infatti la γ secretasi taglia i suoi substrati a livello del dominio transmembrana, in contrasto con la quasi totalita' delle altre proteasi che sono incapaci di esplicare la loro funzione in un ambiente altamente idrofobico, quale e' quello del doppio strato lipidico, e di solito non tagliano i loro substrati quando questi si trovano in una conformazione elicoidale. La presenilina-1 o PS1 e' stata la prima componente del complesso della γ secretasi ad essere identificata (Wolfe et al., 1999). La famiglia delle preseniline di mammifero e' costituita da 2 proteine dette PS1 e PS2, ma proteine ortologhe sono state trovate in tutti i vertebrati, invertebrati ed anche nelle piante. In *C.elegans* sono stati identificati 3 membri della famiglia delle preseniline: Sel-12, che presenta il 42% di omologia con la PS1 umana, e Hop-1 e Spe-4, che invece presentano rispettivamente il 27% ed il 17% di omologia con PS1 umana; e' stato inoltre provato che PS1 e PS2 umane possono vicariare la funzione di sel-12 in vermi mancanti di questa proteina, a dimostrazione della conservazione funzionale di tali proteine nell'evoluzione. I geni di PS1 e PS2 nell'uomo si trovano sul cromosoma 14 ed 1 rispettivamente e mutazioni in questi 2 geni sono responsabili della maggior parte dei casi di FAD (ad

oggi sono state identificate 135 mutazioni nel gene di PS1 e 10 mutazioni nel gene di PS2 associate con casi di FAD. L'oloproteina PS1 è di circa 44kDa e subisce una maturazione endoproteolitica costitutiva che avviene tra il dominio transmembrana 6 e 7 da parte di una attività catalitica sconosciuta chiamata presenilasi. Tale evento endoproteolitico avviene nell'ER e porta alla formazione di eterodimeri stabili. PS1 possiede da 7 a 9 domini altamente idrofobici; il modello topologico più diffuso propone 8 domini che attraversano la membrana, sebbene alcuni dati sperimentali ne suggeriscano 6 o 7: in realtà si è molto dibattuto sul fatto che gli ultimi 2 domini idrofobici possano realmente attraversare la membrana o essere solo perifericamente associati ad essa. I due domini più idrofilici invece, quello N-terminale e quello che forma un loop tra il dominio transmembrana 6 e 7, sono rivolti verso il citosol e sono le parti meno conservate tra le diverse preseniline, anche all'interno della stessa specie, dando probabilmente una certa specificità funzionale alle diverse PS (De Strooper and Annaert, 2000). Tale approfondimento sul rapporto struttura-funzione in PS1 è opportuno per comprendere come queste proteine possono legare e tagliare tante proteine a livello del doppio strato lipidico). Studi farmacologici hanno dimostrato che i 2 residui di Asp nel dominio transmembrana 6 e 7 di PS1 sono necessari per il taglio di APP e degli altri substrati, suggerendo quindi che PS1 possa essere il centro catalitico del complesso enzimatico della γ -secretasi (Wolfe et al., 1999).

La nicastrina, un altro componente del complesso enzimatico della γ -secretasi, è una proteina integrale di membrana di tipo I, che è stata copurificata con PS ed è stato dimostrato essere in grado di modulare la maturazione di APP e Notch, anche se il meccanismo non è stato ancora chiarito del tutto. È stato provato che la nicastrina è in grado di legare i frammenti legati alla membrana prodotti dalla maturazione di APP e di Notch (APP-CTF o Notch-CTF) stabilizzandoli ed aiutandone quindi la metabolizzazione da parte del complesso γ secretasico. Inoltre è stato recentemente dimostrato anche che la mancanza di nicastrina in particolari linee cellulari provoca una rapida degradazione di PS1. Pen-2 ed Aph-1 sono componenti essenziali del complesso enzimatico in quanto ne possono modificare l'attività in risposta a stimoli diversi (Francis et al., 2002; Takasugi et al., 2003; Yu et al., 2000).

Le possibili funzioni di APP

L'affascinante meccanismo che porta alla maturazione di APP non è altro che un esempio particolare di un fenomeno chiamato "proteolisi intramembrana regolata" o RIP, descritta ormai più di 5 anni fa (De Strooper and Annaert, 2000). Questo fenomeno è conservato dai batteri (ne è l'esempio il rilascio di alcuni ferormoni in alcuni ceppi di *Enterococcus* e la regolazione della sporulazione in *Bacillus Subtilis*) fino ai vertebrati. In tutti questi casi, un precursore legato alla membrana è tagliato da una proteasi che taglia all'interno del doppio strato lipidico (intramembrane-cliving-proteases o I-CLIPs), che rilasciano frammenti della proteina ad entrambi i lati della membrana. In molti casi, il RIP prevede un primo taglio proteolitico da parte di una proteasi classica che rimuove un grosso frammento del dominio extracellulare o altre parti regolatrici del precursore transmembrana. Uno dei casi meglio conosciuti, è quello di SREBP (transcription factor sterol regulatory element binding protein): SREBP va incontro ad un primo taglio proteolitico da parte della proteasi s1p, che rimuove la parte C-terminale del precursore transmembrana; la parte N-terminale in questo modo, diviene substrato della proteasi s2p, che determina il rilascio del frammento citosolico, che agisce da fattore trascrizionale inducendo la biosintesi di colesterolo (Brown et al., 2000).

Un altro esempio molto conosciuto è quello di Notch; in questo caso di RIP, però, il primo taglio proteolitico è regolato dal legame di un ligando: infatti solo dopo il legame del ligando di Notch, Delta/Jagged, il recettore Notch è tagliato da parte della metalloproteasi TACE e diventa substrato per la γ -secretasi. In seguito all'azione di quest'ultima, il frammento citosolico rilasciato detto NICD (Notch intracellular domain), è in grado di traslocare nel nucleo, legare un fattore ubiquitario detto CSL/CBF-1 e regolare la trascrizione di specifici geni (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000).

Nonostante tali analogie e considerazioni, però, la regolazione della RIP di APP e di conseguenza la sua funzione sono ancora sconosciuti: capire il meccanismo che regola tale maturazione potrebbe far luce sulle basi molecolari della malattia di Alzheimer e potrebbe portare allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la cura della malattia. Topi KO per APP mostrano solo lievi difetti neurologici con diminuita capacità locomotoria, a dimostrazione che le funzioni di APP, APLP1 2 APLP2 sono ridondanti (Zheng et al., 2005; Heber et al., 2000); inoltre neuroni primari derivanti da topi KO per APP mostrano una vita più corta ed una diminuita capacità a formare neuriti, suggerendo che APP possa avere una funzione nel trasporto assonale, nell'assogènesi e nell' processo di arborizzazione dendritica.

Diversi sottodomini funzionali sono stati identificati nel dominio extracellulare di APP: la sequenza RERMS, che sembra essere responsabile della funzione neurotrofica attribuita ai prodotti extracellulari della maturazione proteolitica di APP (α -APPs e β -APPs), i due siti di legame per l'eparina, responsabili del legame delle molecole di glipicano, ed infine i siti di legame per i metalli come Cu^{++} e Zn^{++} , che però sembrano avere principalmente una funzione strutturale (anche se è stato

dimostrato che APP e' in grado di catalizzare la riduzione del Cu^{++} a Cu^+) (Annaert and De Strooper, 2002).

Essendo una proteina integrale di membrana ed in base alle analogie che la RIP di APP ha con quella di Notch, e' stato ipotizzato che APP possa svolgere una funzione recettoriale; di conseguenza gran parte degli studi si sono concentrati sul grosso dominio extracellulare e sull'identificazione di possibili ligandi, ma la ricerca non è stata molto fruttuosa. L'unico gruppo di proteine che certamente interagisce con le isoforme di APP che contengono il dominio Kunitz è quello delle LRP, proteine di membrana strettamente correlate al recettore delle lipoproteine a bassa densità (Cam et al., 2004; Knauer et al., 1996). LRP e' anche responsabile della clearance di altri complessi inibitori di proteasi come l' α -2-macroglobulina e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipi I. Dal momento comunque che l'isoforma di APP piu' abbondantemente espressa nei neuroni (APP695) non possiede il dominio KPI, la funzione di APP nei neuroni rimane ancora oscura.

Al contrario, molti dati sono oggi disponibili sul corto dominio citosolico di APP, che rappresenta il centro di un complesso sistema di interazioni proteina-proteina. È stato dimostrato, infatti, che il dominio citoplasmatico di APP interagisce con la catena leggera della chinesina (Kamal et al., 2001), una proteina che promuove il movimento di vescicole sinaptiche lungo i microtubuli, suggerendo che il taglio di APP potrebbe regolare il trasporto di vescicole lungo l'assone.

Altri tipi di approcci, come il sistema del doppio ibrido, indicano oltre alla catena leggera della chinesina, il corto dominio citosolico di APP puo' legare altre proteine, in quanto possiede due importanti motivi: il motivo YTSI e quello YENPTY.

Il motivo YTSI si trova vicino all'interfaccia tra citosol e membrana ed e' un motivo di legame per una proteina che lega i microtubuli, PAT-1.

Il motivo YENPTY, storicamente descritto come un motivo per l'internalizzazione delle proteine di membrana, e' anche presente anche in una serie di tirosin chinasi recettoriali (TKR) e non (TK) (Russo et al., 2004); in particolar modo, il residuo di Tyr in questo motivo e' fosforilato in seguito all'attivazione del dominio chinasi, cosicche' tale motivo funziona da sito di attacco per proteine che posseggono un dominio detto dominio di legame alle fosfotirosine (PTB) (Fiore et al., 1995). Alcune di queste proteine che posseggono il dominio PTB e che interagiscono con il motivo YENPTY della corta coda citosolica di APP sono: X11 (Borg et al., 1996), Fe65 (Fiore et al., 1995), mDab (Howell et al. 1997), c-Abl (Zambrano et al., 2001), Shc (Russo et al., 2002), Jip1 (Scheinfeld et al. 2002). La figura 2 e' una rappresentazione schematica della rete di interazioni proteina-proteina centrate attorno al dominio citosolico di APP.

Tra tutte queste interazioni, solo per quella di Shc ed Abl la Tyr682 del motivo YENPTY deve essere fosforilata, mentre tutte le altre interazioni avvengono in maniera fosforilazione-indipendente.

Uno dei primi interattori del dominio citosolico di APP ad essere identificato, nel laboratorio dove ho svolto la tesi, è una proteina altamente espressa nei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico dei mammiferi, chiamata Fe65, che si lega all'elemento NPTY del dominio citosolico di APP attraverso uno dei suoi due domini

PTB (Fiore et al., 1995). Altre due proteine che legano APP attraverso un dominio PTB, a livello della stessa regione coinvolta nell'interazione con Fe65, sono X11 e mDab1. X11 è anch'esso un adattatore molecolare (Borg et al., 1996), la cui funzione è sconosciuta, che lega diverse altre proteine quali Munc18 e CASK (Borg et al., 1999). Alcuni dati sperimentali suggeriscono che alcune di queste interazioni possono in qualche modo influenzare la maturazione proteolitica di APP: in particolare, è stato dimostrato che l'interazione di X11 con APP previene il taglio amiloidogenico dello stesso mentre l'interazione di APP con Fe65 lo aumenta la generazione di A β . mDab1 è l'ortologo di mammifero del prodotto del gene *disabled* di *D.melanogaster*; questa proteina è un modulatore genetico delle mutazioni della tirosina kinasi non recettoriale, Abl. Più recentemente è stato dimostrato che altre due proteine, coinvolte nella trasduzione del segnale, legano la coda citosolica di APP: esse sono la proteina Shc (Russo et al., 2002; Tarr et al., 2002) e JIP-1 (Matsuda et al., 2001; Scheinfeld et al., 2002). Oltre che nel legame della coda citosolica di APP, un coinvolgimento di Shc è stato dimostrato in seguito all'attivazione di numerosi recettori per fattori di crescita (come l'EGF-R ed il PDGF-R), recettori accoppiati a proteine G e recettori per gli ormoni; inoltre un ruolo chiave di Shc è stato ormai provato in molti tipi di tumore (Ravichandran et al., 2001). Nei mammiferi sono stati identificati 3 geni per Shc, chiamati rispettivamente ShcA, ShcB e ShcC; nei mammiferi ShcA è ubiquitariamente espresso, mentre ShcB e ShcC sono espressi prevalentemente nei neuroni (Luzi et al., 2000; Pelicci et al., 1996). ShcA è espresso come tre isoforme di circa 46, 52 e 66 kDa (tutte generate dallo stesso RNA messaggero che è soggetto sia a splicing alternativo che ad eventi alternativi di inizio della traduzione). Tutte le isoforme di Shc posseggono entrambi i domini che permettono di legare tirosine fosforilate (dominio PTB e SH2), ed una regione centrale, chiamata CH1, che contiene invece i residui di tirosina soggetti a fosforilazione (Migliaccio et al., 1997; Pelicci et al., 1992). Il dominio SH2 di Shc, situato nella regione C-terminale della proteina, è responsabile del legame di Shc ai recettori per fattori di crescita attivati, come l'EGF-R ed il PDGF-R (Gelderloos et al., 1998), mentre il dominio PTB ne permette il legame a proteine di membrana che contengono la sequenza di riconoscimento NPTY, come APP ed LRP. Uno dei principali pathway in cui è stato dimostrato il coinvolgimento di Shc è quello della trasduzione del segnale a valle del PDGF-R attivato, determinando l'attivazione prima di Ras e poi della cascata delle MAP chinasi (Bonfini et al., 1996).

L'adattatore molecolare Fe65 ed i suoi ligandi

Fe65 è un adattatore molecolare coinvolto nella rete di interazioni proteina-proteina centrata sulla coda citosolica di APP (Russo et al., 1998).

Il gene è localizzato nell'uomo sul cromosoma 11 (Bressler et al., 1996). Come mostrato in figura 3, Fe65 possiede tre domini di interazione proteina-proteina, cioè due domini PTB ed un dominio WW. Attraverso il dominio WW, Fe65 lega la proteina Mena (Ermekova et al., 1997), l'ortologo di mammifero del prodotto del gene *enabled* di *D.melanogaster*. Questa interazione riveste particolare interesse considerato quanto riportato in precedenza a proposito dell'interazione di mDab1 con APP. Infatti, gli ortologi di Mena e mDab1, *enabled* e *disabled*, in *Drosophila* risultano essere coinvolti nello stesso *pathway* funzionale che interessa il protooncogene c-Abl, che nell'uomo è coinvolto nella patogenesi di alcune leucemie (Cortes et al., 1996). Il fenotipo del moscerino Abl^{-/-} risulta aggravato da mutazioni nel gene *disabled* e migliorato da quelle nel gene *enabled* (Gertler et al., 1995). Queste interazioni genetiche potrebbero essere interpretate come un coinvolgimento competitivo delle proteine Mena e mDab1 nelle funzioni di Abl. Tale ipotesi è avvalorata dal modello di APP e dei suoi ligandi citosolici, in quanto mDab1 da una parte e Fe65-Mena dall'altra competerebbero per il legame al motivo NPTY della coda citosolica di APP. Inoltre anche Abl sembra essere coinvolto in questa complessa rete di proteine: è stato dimostrato che Fe65 può reclutare, in alternativa, attraverso il suo dominio WW, la forma costitutivamente attiva di Abl (Zambrano et al., 2001) divenendone, a sua volta, substrato (Perkinton et al., 2004); evidenze sperimentali indicano per Fe65 anche un ruolo di adattatore tra APP e Abl, consentendo la formazione di un complesso eterotrimerico necessario per la fosforilazione in tirosina (Y682) della porzione C-terminale di APP da parte di Abl (Zambrano et al., 2001); in seguito a tale fosforilazione, il dominio SH2 di Abl è in grado di legare la fosfotirosina di APP.

L'altro dominio di Fe65, PTB1, forma complessi, almeno in vitro, con LRP (Trommsdorff et al., 1998), una proteina di membrana già nota per interagire con APP: è stato recentemente dimostrato la formazione di un complesso trimerico tra LRP-Fe65-APP (Pietrzik et al., 2004). Un altro ligando del PTB1 di Fe65 è il fattore trascrizionale, CP2/LSF/LBP1, identificato tra i loci genici associati ai casi di Alzheimer sporadici: analisi di frazionamento biochimico e cellulare hanno dimostrato la presenza di complessi LSF-Fe65 sia nella frazione citosolica che nucleare (Zambrano et al., 1998). Tale fattore trascrizionale attiva il gene della timidilato sintasi (Powell et al., 2000) e di GS3K β (glycogen synthase kinase-3 β) (Kim et al., 2003). È stato dimostrato che Fe65 ha un ruolo inibitorio sull'attivazione trascrizionale della timidilato sintasi: evidenze sperimentali dimostrano che l'overespressione di Fe65 arresta la crescita cellulare, fenomeno che può essere revertito dall'aggiunta di timidina (Bruni et al., 2002). Un altro dato che supporta l'ipotesi di un ruolo nucleare di Fe65 è l'interazione di Fe65 attraverso il PTB1 con l'istone-acetiltransferasi Tip60 (Cao and Sudhof, 2001).

Numerose evidenze sperimentali stanno indicando il coinvolgimento del complesso Fe65-AICD nella regolazione trascrizionale. L'interazione tra Fe65 ed APP avviene nel citosol, e quindi il taglio di APP ad opera delle secretasi può essere un meccanismo di regolazione della traslocazione nucleare di Fe65 ed AICD, in parziale analogia a quanto avviene per Notch. È stato dimostrato che il frammento intracellulare di APP (AICD), generato dal taglio γ -secretasico, viene stabilizzato da Fe65 e traslocato nel nucleo sotto forma di complesso AICD-Fe65 (Gao and Pimplikar, 2001; Kimberly et al., 2001). È stato dimostrato, inoltre, l'esistenza di un complesso AICD-Fe65-Tip60 che è capace di attivare la trascrizione di geni reporter (Cao and Sudhof, 2001). Tale regolazione trascrizionale sembra essere influenzata dai ligandi di Fe65 e di APP, infatti è stimolata dalla fosforilazione operata da ABL su Fe65 (Perkinton et al., 2004) ed inibita dal dominio intracellulare di LRP (Kinoshita et al., 2003). Il complesso AICD-Fe65 è stato trovato associato al promotore del gene KAI1 (Baek et al., 2002), e risultati sperimentali generati recentemente nel laboratorio dove ho svolto questo lavoro di tesi hanno mostrato che anche il fattore di assemblaggio dei nucleosomi, SET, fa parte di questo complesso (Telese et al., 2004). SET lega Fe65 attraverso una regione che comprende il dominio WW, e sembra essere responsabile della transattivazione mediata da Fe65-AICD. Infine e' di questi ultimi giorni la scoperta che il complesso dimerico delle proteine 14.3.3 γ e' in grado di legare AICD ed Fe65 contemporaneamente, ed in seguito a questo legame si verifica un incremento della trascrizione genica indotta da Fe65 (Sumioka et al., 2005). Quest'ultima appartiene a una famiglia multiproteica, di cui fanno parte altri due membri, Fe65-L1 (Guenette et al., 1996) e Fe65-L2 (Duilio et al., 1998) (Fig. 3). L'omologia di sequenza tra queste proteine è molto elevata quasi esclusivamente a livello dei tre domini funzionali. Al pari del dominio PTB2 di Fe65, i domini PTB2 di Fe65L1 ed Fe65L2 interagiscono con APP con la stessa efficienza di Fe65 (Duilio et al., 1998; Guenette et al., 1996). La ridondanza genico-strutturale suggerisce la stessa funzione di adattatori molecolari con l'unica importante differenza della tessuto-specificità. Studi di espressione hanno dimostrato che Fe65 è espressa soprattutto nel sistema nervoso centrale e periferico (Duilio et al., 1991; Guenette et al., 1996; Simeone et al., 1994); Fe65-L1 è particolarmente abbondante nel muscolo scheletrico e cardiaco, ma anche nel cervello e nel rene (Guenette et al., 1996); Fe65-L2 è espressa ad alti livelli nel cervello e nel testicolo (Duilio et al., 1998)

Il fattore di crescita derivante dalle piastrine PDGF e le molecole che ne traducono il segnale

Il fattore di crescita derivante dalle piastrine o PDGF rappresenta una famiglia di molecole di segnale di particolare importanza nella crescita, nella motilità delle cellule del tessuto connettivo e nello sviluppo embrionale (Heldin, 1997). Da un punto di vista strutturale, le isoforme di PDGF sono dei dimeri di due catene polipeptidiche (A e B) unite da ponti disolfuro, le quali possono formare omodimeri, PDGF-AA o PDGF-BB, o eterodimeri (PDGF-AB) (Leveen et al., 1994; Bostrom et al., 1996).

Le isoforme di PDGF svolgono la loro funzione sulle cellule bersaglio, agendo su due recettori a tirosin chinasi strutturalmente correlati: il recettore α , lega sia le catene polipeptidiche di A che B del PDGF, mentre il recettore β lega solo le catene B (Heldin et al., 1997). Entrambi i tipi di recettore, inoltre, inducono segnali mitogenici e stimolano la riorganizzazione dell'actina; solo il recettore β , ma non quello α , stimola la chemiotassi (Heldin et al., 1996). Negli ultimi anni sono state identificate altre 2 catene polipeptidiche di PDGF, nominate C, D, che possono solo formare omodimeri, ma i meccanismi della loro azione nonché le loro funzioni sono ancora oscure.

Come nel caso di molti recettori a tirosin chinasi, l'attivazione del recettore del PDGF, in seguito al legame del ligando, avviene per dimerizzazione del recettore in modo tale che la giustapposizione dei domini chinasi dei due recettori ne permetta l'autofosforilazione. Tale fenomeno ha la funzione di aumentare l'attività del dominio chinasi intracellulare e di fornire un sito di attracco per le molecole della traduzione del segnale più a valle (Heldin et al., 1996).

La trasduzione del segnale avviene attraverso una rete di interazioni proteina-proteina rese possibili da differenti tipi di domini, tra cui i più importanti sono i domini SH2 e quelli PTB, che permettono di riconoscere tirosine fosforilate in differenti condizioni. Almeno 10 proteine contenenti domini SH2 si legano a tirosine fosforilate del recettore β del PDGF e tra queste possiamo distinguere proteine con attività enzimatica (come per esempio le proteine della famiglia di Src, la PI 3'-chinasi, la fosfolipasi C- γ e le proteine Ras) e adattatori molecolari, che invece servono per connettere il recettore con altre molecole più a valle (Pawson, 1995).

La famiglia delle chinasi Src include diverse protein chinasi omologhe, tra cui troviamo c-Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Lyn ed altre. c-Src è una tirosin chinasi non recettoriale che rappresenta l'omologo cellulare di v-Src, responsabile della capacità trasformante del virus del Sarcoma di Rous (Mori et al., 1993). Tutti i membri della famiglia di Src sono attivati in seguito a stimoli esterni e rappresentano le molecole per la traduzione del segnale accoppiate a molti recettori a tirosin chinasi e recettori associati a proteine G (Twamley-Stein et al., 1993).

Le proteine Src posseggono diversi domini di interazione proteina-proteina mediante i quali sono in grado di svolgere la loro funzione di trasduttori del segnale: in particolare esse sono in possesso di 1 dominio SH4 N-terminale, un dominio SH3, un

dominio SH2 ed un dominio chinamico separato dal precedente da uno stretch di aminoacidi linker (Kaplan et al., 1988).

Il dominio SH4 N-terminale contiene diversi residui importanti per la localizzazione a livello della membrana dei membri della famiglia Src. Il dominio SH3 serve per il legame a proteine ricche in prolina che contengono la sequenza di riconoscimento PXXP. Il dominio SH2 invece serve per il legame con proteine che posseggono un residuo di tirosina fosforilato circondato da una sequenza consenso, come avviene nel caso del legame tra Src e la coda citosolica del recettore del PDGF (Pellman et al., 1985).

Altre importanti molecole di segnale che si trovano a valle dell'attivazione del recettore del PDGF sono la fosfatidil-inositolo-3' chinasi (PI3'-chinasi), che determina la fosforilazione del fosfatidil-inositolo(4,5)bisfosfato in trifosfato (Fantl et al., 1992). Gli effettori a valle di tale chinasi sono la Ser/Thr chinasi Akt, la protein chinasi C e la famiglia di proteine leganti il GTP Rho e Ras (Panayotou et al., 1996).

La fosfolipasi C- γ e' un altro enzima a valle dell'attivazione del recettore del PDGF ed utilizza il fosfatidilinositolo(4,5)bisfosfato come substrato, producendo il diacilglicerolo (DG), che attiva i membri della famiglia della PKC, e inositotrifosfato (IP3), che mobilizza le riserve di Ca^{++} intracellulare (Ronnstrand et al., 1992).

Altri effettori importanti che si trovano a valle sia del recettore del PDGF attivato che di Src sono rappresentati dalle famiglie delle piccole proteine leganti il GTP Ras e Rho. Tali proteine sono attivate in seguito alla conversione dalla forma legante il GDP alla forma legante il GTP, da parte del fattore scambiatore di nucleotidi Sos1 legato all'adattatore molecolare Grb2. L'evento chiave in tale attivazione e' la traslocazione del complesso Grb2/Sos1 a livello della membrana in seguito al legame diretto con la catena β del recettore del PDGF attivato. Le proteine Ras/Rho sono poi inibite quando il GTP legato e' defosforilato a GDP, un processo catalizzato dalle proteine attivanti le GTPasi, dette GAP, e da fattori scambianti la guanosina, dette GEF (Ardivissov et al., 1994). Effettori a valle delle proteine Ras sono rappresentati dalle MAP chinasi, che svolgono la loro funzione principalmente stimolando la crescita cellulare, mentre gli effettori a valle delle proteine Rho non sono stati ancora tutti chiaramente identificati, ma di questa categoria fanno sicuramente parte le Ser/Thr chinasi MEKK e PAK, che svolgono invece la loro funzione nell'organizzazione dell'actina del citoscheletro (Marshall et al., 1994).

Obiettivi della tesi

La funzione di APP e la regolazione della sua maturazione proteolitica, che porta alla generazione del peptide β -amiloide, sono oggetto di studio intenso da ormai molto tempo, viste le sue implicazioni nella patogenesi della malattia di Alzheimer. L'analisi dei singoli knock-out, nel sistema murino, di APP, APLP1 ed APLP2 mostrano un fenotipo indistinguibile da quello di un topo di tipo selvatico (Heber et al., 2000; von Koch et al., 1997; Zheng et al., 1995), mentre i doppi knock-out combinati (Heber et al., 2000) APP-APLP2 ed APLP1-APLP2 mostrano fenotipi troppo severi e non studiabili, in quanto i topi muoiono prima della nascita o subito dopo. Questi risultati dimostrano che i geni della famiglia di APP sono essenziali ma parzialmente ridondanti nei mammiferi.

Il grande impegno profuso nel cercare di comprendere i meccanismi coinvolti nei differenti tipi di taglio di APP ha portato all'identificazione ed alla caratterizzazione molecolare di gran parte degli enzimi maturativi responsabili di tale maturazione proteolitica. Allo stesso tempo però, nonostante tali sforzi, la funzione di APP nonché i meccanismi che ne regolano il processo maturativo non sono stati ancora chiariti. Pertanto scopo della presente tesi è stato quello di sviluppare un sistema sperimentale in grado di identificare eventuali ligandi diretti del dominio extracellulare di APP, oppure possibili segnali extracellulari in grado di indurre o regolare in qualche modo la sua maturazione proteolitica. Come si può facilmente comprendere, l'individuazione di eventuali molecole o segnali coinvolti in tale regolazione sarebbe di vitale importanza, in quanto darebbe nuove informazioni per risolvere il problema della funzione di APP, e contemporaneamente porterebbe alla luce nuovi bersagli farmacologici, sulla base dei quali ideare nuovi farmaci in grado di bloccare o almeno diminuire la produzione del peptide β -amiloide.

MATERIALI E METODI

oligonucleotide sintetico a doppio filamento con la sequenza di Hind III modificata all'estremità 5' (la sequenza di un singolo filamento è':
5'-AGCTAACTAAGGCCATGCTGCCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCG
CCTGGACGGCTCGGGCGCTGA-3'.

Successivamente, i frammenti di PCR codificanti per le porzioni N-terminali del cDNA di APP695 umano usati per la generazione di questi mutanti sono stati ottenuti con i seguenti primers:

- A) D19-119, 5'-CCCAAGCTTGGTGAGTTTGTAAGTGATGCCCTTC-3'
- B) D19-260, 5'-CCCAAGCTTCCCTACGAAGAAGCCACAGAGAG-3'
- C) D19-467, 5'-CCCAAGCTTCAGTCTCTCTCCCTGCTCTACAAC-3'
- D) D19-581, 5'-CCCAAGCTTGGGTTGACAAATATCAAGACGGAGG-3'

Il primer reverse, comune a tutti i mutanti N-terminali, è':

5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTG-3'

I mutanti di delezione C-terminali sono stati generati invece amplificando tramite PCR i frammenti di cDNA di APP695 umano utilizzando il seguente primer forward comune a tutti i mutanti:

5'-CCCAAGCTTACTAAGGCCATGCTGCCCCGGTTTGGCACTGC-3'.

I primers reverse usati sono:

A) DC07,

5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCTTGTAGGTTGGATTTTCGTACGGC-3'

B) DC14,

5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGCCGTTCTGCTGCATCTTGGAC-3'

C) DC44,

5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTTCTTCTTCAGCATCACCAAGG-3'.

I prodotti di PCR dei mutanti N- e C- terminali sono poi stati clonati nel vettore, contenente Gal4 ed il peptide segnale, tra i siti di restrizione Hind III e NotI.

Le sequenze di tutti i siti di restrizione inseriti nei primers sono sottolineate, mentre quelle delle Gly sono indicate in italico.

Le mutazioni puntiformi sono state introdotte nel costrutto APP-Gal4 selvatico mediante mutagenesi sito diretta (Stratagene mutagenesis kit) utilizzando primers complementari portanti le mutazioni puntiformi desiderate. Le sequenze dei primers forward corrispondenti sono:

per il mutante Y682G,

5'-CCAAGATGCAGCAGAACGGCGGGCGAAAATCCAACC-
TACAAGTTCTTTG-3'

per il mutante N684A,

5'-AAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAGCTCCAACCTA-
CAAGTTCTTTGAGCA-3'

per il mutante Y687A,

5'-CGGCTACGAAAATCCAACCGCCAAGTTCTTTGAGCAGATGC-3'

per il mutante D664N,

5'-GGTGTGGTGGAGGTTAACGCCGCTGTCACC-3'

I nucleotidi sottolineati rappresentano le posizioni mutate.

Il corretto inserimento dei frammenti, il rispetto delle corrette cornici di lettura e l'inserimento delle corrette mutazioni sono stati controllati per analisi di restrizione e di sequenza.

I vettori di espressione per Fe65, Fe65 C655F, Fe65 Δ PTB, X11, Jip1 ed mDab1 erano già disponibili nel laboratorio dove questo lavoro di tesi è stato svolto.

I vettori di espressione per Src, SrcYF, SrcYFKM, Rac1, Rac QL e RacN17 sono stati ottenuti per gentile concessione di Silvio Gutking e Mario Chiariello; i plasmidi di Shc, Notch e Abl-PP sono stati invece ottenuti da Massimo Santoro, Raphael Kopan e Daniela Barila' rispettivamente.

Colture cellulari e generazione dei cloni di cellule HeLaAG

Cellule Hela selvatiche, HeLaAG, HEK293 e CHO sono state tutte cresciute a 37°C in presenza di 5%CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino, 100unita'/ml di penicillina, e 100 ug/ml di streptomina (Hyclone). Le cellule C6 e le NIH3T3 e le rispettive co-culture sono state cresciute a 37°C in presenza di 5% CO₂ in mezzo RPMI (Invitrogen) con l'aggiunta di 10% di siero fetale bovino e di antibiotici.

Per la generazione di cloni di cellule HeLaAG, il vettore di espressione di APP-Gal4, contenente il gene di resistenza alla neomicina, e' stato trasfettato nelle cellule HeLa mediante il metodo del calcio fosfato, e dopo 14 giorni di selezione in G418 (900µg/ml e' stata la concentrazione finale della G418 nel mezzo di crescita delle cellule), sono stati isolati diversi cloni resistenti. Per tutti gli esperimenti riportati sono stati utilizzati 2 pools di questi cloni, chiamati HeLaAG.

Trasfezioni e trattamenti farmacologici

Per il saggio CAT, 5×10^5 cellule HeLaAG in piastre da 60-mm venivano transientemente trasfettate con il metodo del calcio fosfato con 3 ug del vettore G5BCAT, nel quale la trascrizione dell'enzima cloramfenicolo acetil transferasi e' sotto il controllo del promotore responsivo al fattore trascrizionale di lievito Gal4; e' stata sempre trasfettata la stessa quantita' di ogni plasmide (3ug) e la quantita' totale di DNA nelle co-trasfezioni era sempre portata a 10 μ g con il vettore vuoto pRC-CMV. Tutte le trasfezioni per il saggio CAT con le HeLaAG sono state effettuate con il metodo del calcio fosfato. Per la determinazione di A β nel mezzo, le cellule HEK293 sono state trasfettate in piastre da 35-mm con i vettori di espressione di APP695, SrcYF, Fe65 e Shc p46 (0.5 ug di ogni vettore per trasfezione) utilizzando il kit Lipocectamine 2000 (Invitrogen) seguendo le istruzioni del fornitore.

Cellule HeLa selvatiche o HeLaAG, 24 ore dopo la trasfezione con il vettore G5BCAT, sono state trattate per 16-24 ore con 40ng/ml di PDGF umano ricombinante (Sigma), 5-10 ug/ml della frazione AS40% oppure con la frazione di 200 μ l fluita dalla Sephadex G-75, diluita in DMEM senza siero in un vol μ Me finale di 2ml. I trattamenti con gli inibitori sono stati effettuati per i tempi indicati alle seguenti concentrazioni: 10 μ M PP2 (Calbiochem), 2 μ M AG1296 (Calbiochem), 30 μ M genisteina (Calbiochem), 10 μ M inibitore della γ secretasi composto X (Calbiochem), 100 μ M PD098059 (Sigma), 100nM wortmannina (Sigma), 50 μ M Z-DEVD-fmk (Alexis).

Purificazione dell'attività che induce il taglio di APP-Gal4

Cellule C6 sono state cresciute a confluenza nelle condizioni descritte sopra in 100 piastre da 150mm di diametro (Falcon). Ogni piastra è stata poi lavata 2 volte con PBS e sono state cresciute in mezzo RPMI senza siero. Dopo 3 giorni di incubazione, sono stati raccolti 3 litri di mezzo condizionato, che è stato centrifugato a 1000rpm per eliminare i detriti cellulari, ed infine è stato concentrato a 480ml utilizzando i Centriplus YM-3000 (Amicon).

Successivamente, 104 g di ammonio solfato sono stati aggiunti al mezzo condizionato concentrato per ottenere una soluzione di ammonio solfato al 40%, che è stata agitata overnight a 4°C e poi centrifugata a 9000rpm per 2 ore. La saturazione di ammonio solfato al 70% è stata raggiunta aggiungendo 87.4 g di ammonio solfato alla soluzione con il 40% di saturazione, mentre il 100% di saturazione è stato raggiunto aggiungendo 100.3 g di sale alla soluzione satura al 70%.

I precipitati sono stati dissolti in 15ml di PBS e dializzati 2 volte in 5 litri di PBS. 1mg di questo campione è stato separato per FPLC, usando una colonna Sephadex G-75 pre-equilibrata in PBS, ad una velocità di 0.25ml/min mentre le frazioni venivano raccolte ogni 1.6 min.

Bande di SDS-PAGE sono state escisse da gel, triturate, e lavate con acqua. Le proteine sono state ridotte in gel, S-alchilate con iodoacetamide, e digerite con tripsina. Le aliquote digerite sono state soggette a passaggi di desalinazione/concentrazione prima di essere sottoposte ad analisi di spettrometria di massa (MALDI-TOF). Le miscele di peptidi sono state caricate sullo strumento ed analizzate usando uno spettrometro di massa Voyager-DE PRO (Applied Biosystem). È stato poi utilizzato il software PROWL per identificare le proteine in maniera non ambigua da una data base di sequenze non ridondanti.

L'immunodeplezione della frazione di AS40% è stata ottenuta incubando 20µg della frazione diluita in 500µl di PBS con 60µg dell'anticorpo anti-PDGF (Sigma) o con 60µg di IgG di mouse di controllo (Sigma) per 2 ore a 4°C. Le miscele sono state cromatografate utilizzando 20µl di proteina A-G Sepharosio (Santa Cruz Biotechnology) per 30 min a 4°C e, dopo centrifugazione, i supernatanti sono stati diluiti in DMEM senza siero ad una concentrazione finale di 2ml.

Preparazione di estratti cellulari e Western blotting

Per la preparazione degli estratti proteici da sottoporre ad SDS-PAGE, le cellule sono state raccolte in PBS freddo, risospese in buffer di lisi (40mM Tris-HCl, pH=7.2, 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA) in presenza di una miscela di inibitori di proteasi (complete EDTA free – Roche Applied Science) e tenute in ghiaccio per 15 minuti. Gli estratti successivamente sono stati centrifugati a 14000rpm a 4°C per eliminare i detriti cellulari e le membrane. 20µg di ogni estratto è stato risolto su un gel gradiente 4-12% di SDS-poliacrilamide (InVitrogen) in condizioni riducenti, che è stato poi trasferito su membrane Immobilon-P (Millipore).

I filtri sono stati preincubati in una soluzione al 5% di latte scremato in PBS-Tween (PBS e 0,05% Tween-20), e successivamente incubati in 1% latte/PBS-Tween con opportune diluizioni dell'anticorpo primario overnight a 4°C. L'eccesso di anticorpo primario è stato rimosso mediante dei lavaggi sequenziali dei filtri in T-PBS; successivamente una diluizione 1:5000 di un appropriato anticorpo secondario (coniugato alla per ossidasi di rafano) è stata aggiunta ai filtri per 30 minuti a temperatura ambiente. L'eccesso di anticorpo secondario è stato ancora una volta rimosso mediante lavaggi sequenziali dei filtri con T-PBS; Le proteine sono state rilevate con il sistema della chemiluminescenza ECL (Amersham). Gli anticorpi usati e le loro diluizioni erano rispettivamente: anti APP 6E10 (Sigma) 1:1000; anti APP CT695 (Zymed Lab.) 1:250; anti PDGF (Sigma) 1:750; anti Gal4DBD (Calbiochem) 1:1000; anti phosphoERK (Santa Cruz) 1:1000; anti phosphoAKT (Santa Cruz) 1:1000; anti Fe65 I12 1:2000; anti caspase 3 (Upstate) 1:1000.

Per i saggi CAT, cellule HeLa ed HeLaAG transientemente trasfettate sono state raccolte in buffer TEN freddo (40mM Tris-HCl, pH=7.5, 1mM EDTA, 150mM NaCl), lisate per congelamento a -80°C e scongelate rapidamente a temperatura ambiente, e risospese in buffer di lisi (10mM Hepes, pH=7.9, 0.1mMEGTA, 0.5mM DTT, 5% glicerolo, 0.2mM PMSF, 400mM NaCl). Gli estratti totali sono stati centrifugati a 14000rpm a 4°C per eliminare le membrane ed i detriti cellulari e la loro concentrazione proteica è stata determinata mediante il BioRad Protein Assay.

Per la determinazione della concentrazione delle proteine è stato usato il BioRad Protein Assay Reagent. Aliquote opportune delle miscele proteiche da analizzare sono state diluite ad 800 µl con acqua, dopodiché ai campioni è stato aggiunto 200 µl di reagente BioRad, e le rispettive letture spettrofotometriche sono state determinate alla lunghezza d'onda di 595 nm. Per risalire alla concentrazione delle proteine ci si è serviti di una retta di taratura costruita sulla base dei valori di assorbanza ottenuti con quantità note di albumina di siero bovino (BSA).

Saggi reporter

Per i saggi CAT, 150µg di ogni estratto e' stato utilizzato per ogni reazione e le misurazioni della concentrazione dell'enzima sono state effettuate mediante il colorimetric CAT enzyme-linked immunoadsorbent assay (Roche Applied Science).

Per i saggi luciferasi invece e' stato utilizzato un lµMenometro Berthold, seguendo le istruzioni del fornitore.

La quantita' di Aβ 1-40 e' stata misurata in triplicato dai mezzi condizionati di HEK293 transientemente trasfettate con APP695, Shc p46, Fe65 o SrcYF. 48 ore dopo la trasfezione, sono stati raccolti 100µl di mezzo di coltura e saggiati con un EIA kit (IBL, Gunma, Giappone) secondo le istruzioni del fornitore.

RISULTATI

Il mezzo condizionato delle C6 possiede un'attività che induce l'accumulo di CAT in cellule HeLa stabilmente esprimenti la proteina di fusione APP-Gal4.

Allo scopo di individuare gli stimoli extracellulari che possono indurre il taglio di APP mediato da β e γ secretasi, abbiamo sviluppato un sistema sperimentale nel quale il fattore trascrizionale di lievito Gal4 è stato fuso al dominio citosolico di APP695. Questo sistema è basato sulla predizione che in cellule overesprimenti tale proteina di fusione APP-Gal4, dopo il taglio di questa molecola da parte di enzimi maturativi, AID-Gal4 è rilasciato dalla membrana e può così attivare la trascrizione del gene cloramfenicolo acetiltransferasi (CAT) clonato a valle del promotore di Gal4 nel vettore G5BCAT. Sulla base di questo sistema sperimentale, cellule HeLa sono state trasfettate con il vettore di espressione di APP-Gal4, contenente il gene di resistenza al G418, e sono stati isolati diversi cloni stabilmente esprimenti la proteina di fusione APP-Gal4.

La Figura 4B mostra gli estratti da diversi cloni di cellule HeLa incubati sia con l'anticorpo anti APP che con quello anti Gal4 e dimostra l'espressione di una proteina della giusta altezza riconosciuta da entrambi gli anticorpi. Gli esperimenti riportati in seguito sono stati condotti utilizzando 2 pools di questi cloni, HeLaAG1-8 e HeLaAG9-14, successivamente indicati solo come HeLaAG.

Al fine di investigare la possibilità che il taglio proteolitico di APP possa essere indotto sia da fattori ancorati alla membrana cellulare che da fattori secreti dalle cellule, il primo approccio sperimentale adottato è stato quello di co-cultivare le cellule HeLaAG, transientemente trasfettate con il vettore G5BCAT, con linee cellulari di diverse origini e di misurarne l'accumulo di CAT.

La figura 4C mostra che la co-coltura delle HeLaAG con cellule C6 determina un aumento significativo dell'espressione di CAT nelle HeLaAG, mentre non ci sono cambiamenti significativi nell'espressione di CAT nelle co-coltivate con altre linee cellulari, come per esempio le NIH3T3. Le cellule C6 derivano da glioma di ratto e sono note per secernere molti fattori di crescita (Westermann et al., 1988).

Di conseguenza, ci siamo chiesti se il mezzo condizionato delle C6 è in grado di mimare l'effetto sull'accumulo di CAT nelle HeLaAG osservato nel caso delle co-culture. Come mostrato in Fig.4C, le cellule HeLaAG, cresciute in presenza del mezzo condizionato delle C6, esprimono livelli di CAT più alti rispetto a cellule cresciute nel mezzo condizionato delle HeLa o delle NIH3T3.

Purificazione dal mezzo condizionato delle C6 dell'attività' che induce il taglio di APP-Gal4

Una preparazione in larga scala di mezzo condizionato delle C6 e' stata utilizzata come fonte per la purificazione di una o piu' molecole in grado di indurre l'accumulo di CAT nelle HeLaAG trasfettate con il vettore G5BCAT. La Fig.5 mostra i passaggi successivi di questa purificazione basata sulla precipitazione con ammonio solfato (AS), cromatografia ad esclusione molecolare e SDS-PAGE. L'attività' e' ristretta alla frazione di ammonio solfato di 40% (AS40%) (Fig.5A), che e' stata poi sottoposta a FPLC. Le frazioni eluite dalla colonna cromatografica sono poi state saggiate per la loro capacità' di indurre l'accumulo di CAT nelle HeLaAG, ed i risultati ci hanno permesso di identificare 2 picchi di attività' di circa 70 e 30 kDa rispettivamente (Fig.5B). L'SDS-PAGE delle proteine presenti nelle frazioni rilevanti, comparate con le frazioni prive di attività', hanno indicato una banda di circa 15kDa come un buon candidato (Fig.5C). Questa banda, escissa dal gel, e' stata poi digerita con tripsina ed analizzata tramite spettrometria di massa (MALDI-TOF).

L'analisi della sequenza di tale banda ci ha permesso di identificarla in maniera non ambigua come il PDGF-BB. Per confermare questa identificazione, le frazioni rilevanti sono state sottoposte ad elettroforesi ed incubate con un anticorpo anti PDGF. Tale Western Blot dimostra che il PDGF e' presente solo nelle frazioni che attivano l'accumulo di CAT nelle cellule HeLaAG (Fig.5D)

Il PDGF induce un accumulo di CAT in cellule HeLaAG attraverso l'attivazione del suo stesso recettore.

Cellule HeLaAG sono state esposte a 40ng/ml di PDGF-BB umano purificato per 12 ore, provocando una drammatica induzione nell'espressione di CAT (Fig.6). Questo fenomeno dipende dall'attivazione del recettore del PDGF (PDGF-R), in quanto il trattamento delle HeLaAG con un inibitore non specifico delle tirosin chinasi, come la genisteina, oppure con un inibitore specifico del PDGF-R, AG1296, provoca un significativo decremento nell'accumulo di CAT in seguito a trattamento con PDGF. Sebbene, inaspettatamente, il PDGF sia presente anche nella frazione di 70kDa della cromatografia ad esclusione molecolare (vedi Fig.5 Ce D), non puo' essere escluso che altre molecole con un'attivita' simile a quella del PDGF possano essere presenti nel mezzo condizionato delle C6. Per rispondere a questo punto, cellule HeLaAG sono state trattate con AS40% e con l'inibitore del PDGF-R. Anche in questo caso, l'accumulo di CAT e' stato prevenuto dall'inibitore del PDGF-R, supportando in questo modo l'ipotesi che il PDGF sia l'unico fattore, presente nel mezzo condizionato delle C6, che attiva il taglio di APP-Gal4. Inoltre, l'immunodeplezione della frazione di AS40% con l'anticorpo anti-PDGF provoca un'abolizione dell'accumulo di CAT, mentre l'immunodeplezione effettuata con IgG di topo di controllo non ha dato effetti. Di conseguenza, l'attivita' presente nella frazione di 70kDa potrebbe essere dovuta ad un multimerico di subunita' di PDGF.

L'aumento della concentrazione di CAT in cellule HeLaAG trattate con PDGF e' dovuto specificamente al Gal4 rilasciato dopo il taglio di APP-Gal4

Per escludere la possibilita' che il trattamento con PDGF possa indurre accumulo di CAT attraverso un meccanismo indipendente dal taglio di APP-Gal4, cellule HeLa selvatiche, trasfettate con il vettore vuoto o con il vettore di espressione di Gal4, sono state esposte a 40ng/ml di PDGF-BB. Come mostrato in Fig.7A, il trattamento con PDGF-BB non ha modificato l'accumulo di CAT. Di conseguenza, l'accumulo di CAT osservato nelle HeLaAG esposte a PDGF e' dovuto all'attivazione della trascrizione del gene CAT a partire dal Gal4 rilasciato in seguito al taglio di APP-Gal4. Per confermare ulteriormente questo punto, estratti di HeLaAG, trattate con PDGF o con AS40%, sono stati analizzati per Western blot con un anticorpo anti-APP o anti-Gal4. Questi esperimenti mostrano, utilizzando entrambi gli anticorpi, sia quello anti Gal4 che quello anti APP (che ne riconosce il dominio citosolico), la presenza, negli estratti di HeLaAG trattate con PDGF o AS40%, di una banda di dimensioni molto simili a quella di Gal4 (vedi Fig.7B). Un Western blot simile e' stato incubato con l'anticorpo 6E10, che, invece, e' diretto contro la sequenza N-terminale del peptide β amiloide. Questo anticorpo riconosce quindi la forma non tagliata di APP, ma non quella tagliata. Questo significa che la forma tagliata contiene il dominio C-terminale (AID-Gal4) ma non la sequenza N-terminale di A β .

Il PDGF induce il taglio proteolitico di APP-Gal4 nelle HeLaAG in maniera dipendente dalle tirosin chinasi non recettoriali Src e Rac.

Ci sono molte vie metaboliche attivate in seguito all'interazione del PDGF-R con il suo fattore di crescita. Il PDGF-R fosforilato in tiroxina attiva la via di Ras-MAPK attraverso Grb2/SOS e Shc/Grb2/SOS. Il possibile coinvolgimento di questa via nell'induzione del taglio di APP-Gal4 da parte del PDGF e' stato preso in considerazione trattando cellule HeLaAG esposte a PDGF con l'inibitore delle ERKs, PD098059; questo inibitore non modifica gli effetti sia del PDGF che della frazione AS40% sul taglio di APP-Gal4 (vedi Fig.8A). Un'altra via che media gli effetti dell'attivazione del PDGF-R e' quella di PI3K-Akt. Come si puo' osservare in Fig. 8, pero' l'inibitore della PI3K, la wortmannina, non influenza l'accumulo di CAT indotto sia dal PDGF che dalla frazione AS40% nelle HeLaAG.

Src e gli altri membri della famiglia delle tirosin chinasi non recettoriali interagiscono e sono attivati allo stesso tempo dal PDGF-R (Kypta et al., 1990). Per esplorare questa via, le cellule HeLaAG sono state trattate con un inibitore specifico dell'attivita' tirosin chinasica di Src, PP2, e con un composto correlato ma incapace di inibire Src, PP3. Il trattamento con PP2 delle HeLaAG quasi completamente abolisce l'accumulo di CAT osservato dopo esposizione a PDGF o alla frazione AS40%, mentre il trattamento con PP3 e' completamente inefficace.

Per approfondire ulteriormente questo dato, cellule HeLaAG sono state transientemente trasfettate con il vettore esprimente il mutante costitutivamente attivo di Src, SrcYF (Hirai et al., 1990). Come mostrato nella Fig.8B, l'espressione di SrcYF determina nelle HeLaAG un'accumulo di CAT in assenza della stimolazione sia del PDGF che della frazione di AS40%. D'altro canto, cellule HeLaAG trasfettate con il mutante dominante negativo di Src (SrcYFKM) (Snyder et al., 1985) ed esposte a PDGF o alla frazione di AS40% mostrano una diminuzione significativa nell'accumulo di CAT rispetto alle cellule trasfettate con il vettore di controllo e trattate con il PDGF.

I possibili effettori a valle di Src non sono completamente conosciuti. Uno di questi fattori a valle e' la tirosin chinasi non recettoriale Abl (Furtoss et al., 2002). Il possibile ruolo di Abl nel taglio di APP-Gal4 e' stato esplorato trasfettando le cellule HeLaAG con il mutante costitutivamente attivo di Abl (Abl-PP) (Barila' et al., 1998). In queste condizioni, non e' stata osservata nessuna induzione del taglio di APP-Gal4, indicando cosi che tale chinasi non e' coinvolta in questo fenomeno. Al contrario, un'altra molecola, che e' stata recentemente scoperta essere attivata dal PDGF e da Src, e' Rac1, che appartiene alla famiglia delle proteine G Rho dipendenti. La trasfezione delle HeLaAG con il vettore di espressione del mutante costitutivamente attivo di Rac1, RacQL (Chiariello et al., 2001), determina un aumento del CAT simile a quello osservato in seguito alla trasfezione con SrcYF; la co-trasfezione di SrcYF con il mutante dominante negativo di Rac, RacN17, diminuisce significativamente la quantita' di CAT, rispetto invece al CAT accumulato nelle cellule trasfettate solo con SrcYF. Inoltre, una simile inibizione sull'accumulo di CAT in seguito ad esposizione a PDGF delle cellule HeLaAG e' stato osservato in cellule trasfettate solo con RacN17.

L'accumulo di CAT nelle cellule HeLaAG trattate con PDGF oppure trasfettate con Src o con Rac dipende dall'attività dell'enzima γ secretasi.

Allo scopo di capire se l'induzione del taglio di APP-Gal4 da parte del PDGF richiede l'attività della γ secretasi, cellule HeLaAG esposte a PDGF o alla frazione AS40% sono state trattate con l'inibitore della γ secretasi, composto X (Beher et al., 2001). Come mostrato in Fig.9A, tale trattamento provoca un'abolizione degli effetti determinati dal PDGF sull'accumulo di CAT. Questo risultato indica che il PDGF, attraverso l'attivazione del suo stesso recettore, induce il taglio proteolitico di APP-Gal4, che richiede l'attività della γ secretasi.

Per accertare il fatto che anche Src e Rac1, come il PDGF, inducono il taglio di APP-Gal4 attraverso un meccanismo dipendente dalla γ secretasi, cellule HeLaAG sono state trasfettate con SrcYF o con RacQL, le forme costitutivamente attive di queste 2 proteine, e sono state trattate con l'inibitore della γ secretasi. Come mostrato in Fig.9B, l'inibitore abolisce quasi completamente gli effetti delle trasfezioni di SrcYF e RacQL.

Il PDGF induce la generazione di A β a partire da APP selvatico attraverso un meccanismo dipendente da Src.

I risultati riportati finora indicano una chiara dipendenza del taglio di APP-Gal4 indotto dal PDGF-Src dalla γ secretasi, ma non ci permettono di distinguere tra il taglio dell' α o della β secretasi, che precedono il taglio della γ secretasi. Per rispondere a questo punto, abbiamo esaminato gli effetti del PDGF e di Src sul taglio di APP selvatico, misurando l'accumulo di A β in cellule in coltura, nelle quali la via del PDGF e' attivata o bloccata.

Cellule HEK293 sono state trasfettate con APP695 da solo oppure con APP695 e SrcYF. Come mostrato in Fig. 10A, c'e' un significativo aumento di A β nel mezzo di coltura di cellule trasfettate con SrcYF. Inoltre, cellule CHO stabilmente esprimenti APP695, che genera livelli piu' alti di A β , sono state trattate con due concentrazioni dell'inibitore di Src, PP2. In queste condizioni, la generazione di A β e' significativamente diminuita, mentre il composto correlato PP3, che non inibisce l'attivita' di Src, non ha nessun effetto sulla produzione di A β (vedi Fig.10B)

Il dominio citosolico di APP e non il suo dominio extracellulare e' necessario per il taglio proteolitico di APP-Gal4 indotto dal PDGF

Allo scopo di esaminare le caratteristiche strutturali di APP che sono necessarie per permettere al PDGF di indurre il taglio, sono stati generati una serie di mutanti di delezione del dominio extracellulare/intraluminale di APP, e questi cDNA sono stati clonati nella giusta cornice di lettura con quello codificante per l'intero fattore trascrizionale Gal4. Questi costrutti, sotto il controllo del promotore di citomegalovirus, dirigono l'espressione di queste proteine di fusione nelle quali Gal4 e' fuso alla coda C-terminale dei mutanti di delezione di APP ed ognuno di essi possiede anche il peptide segnale che ne permette la giusta collocazione nella membrana. Questi vettori di espressione sono stati trasfettati nelle cellule HeLa insieme al vettore G5BCAT; 24 ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con PDGF o meno in modo da valutare la capacita' del fattore di crescita di indurre il taglio di ogni costrutto. Come mostrato in Fig.11A, tutti i mutanti di delezione del dominio extracellulare/intraluminale sono responsivi al trattamento con PDGF allo stesso modo, indicando cosi che questo dominio di APP non e' coinvolto nella risposta al PDGF. Non e' stato possibile utilizzare un mutante di delezione addizionale, rappresentato dalla Cys99 fusa a Gal4, dato l'alto livello di espressione basale di CAT osservato dopo la trasfezione, indipendentemente al trattamento con PDGF. Allo stesso modo, sono stati generati tre mutanti di delezione del dominio intracellulare di APP (IC) e sono stati clonati nella stessa cornice di lettura con l'intera proteina Gal4. L'analisi di questi tre mutanti di delezione ha permesso di osservare che la rimozione dei 14 residui C-terminali di APP determina l'abolizione della responsivita' al PDGF (vedi Fig. 11B). Questo risultato e' in accordo con quelli che dimostrano che la delezione del dominio YENPTY presente in questa regione abolisce il taglio di APP mediato da β secretasi e diminuisce fortemente la produzione di A β (Perez et al., 1999).

Il PDGF attiva specificamente il taglio proteolitico di APP dipende da γ secretasi mentre non ha nessun effetto sul taglio γ secretasico di Notch

L'abolizione degli effetti del PDGF sul taglio di APP-Gal4 osservato con i mutanti del dominio citosolico di APP suggerisce che la via del PDGF-Src-Rac puo' attivare specificamente il taglio di APP e non quello di altri substrati della γ secretasi che mancano dei segnali specifici presenti in APP. Per rispondere a questo punto, sono stati esaminati gli effetti della via attivata dal PDGF su Notch, un altro substrato del macchinario della γ secretasi. A questo scopo, quindi, cellule HeLa sono state trasfettate con Notch o con il suo mutante di delezione Notch ΔE , e con un plasmide, in cui il gene della luciferasi e' trascritto sotto il controllo degli elementi in cis riconosciuti dal co-fattore di Notch, CBF1. Come mostrato in Fig.12, in cellule trasfettate con l'intera proteina Notch, l'espressione del gene reporter non e' attivata in seguito al trattamento con PDGF, ed in cellule trasfettate con Notch ΔE , che e' il substrato della γ secretasi (Kopan et al., 1996), i trattamenti con l'inibitore del PDGF-R (AG1296) o con l'inibitore di Src, PP2, non hanno alcun effetto. Come atteso, invece, il trattamento con l'inibitore della γ secretasi blocca completamente l'espressione genica della luciferasi. Questi risultati supportano l'ipotesi di un effetto specifico del PDGF sul taglio di APP. Considerando i dati riportati nella Fig.11B, e' possibile che uno o piu' ligandi specifici del dominio citosolico di APP possano giocare un ruolo chiave nell'induzione del taglio di APP da parte del PDGF.

I ligandi del dominio citosolico di APP hanno un effetto sul taglio di APP-Gal4 indotto dal PDGF

La regione del dominio citosolico di APP, le cui delezioni provocano l'abolizione della risposta al PDGF, contiene il motivo YENPTY che è noto interagire con numerose proteine che posseggono un dominio PTB. Per valutare il ruolo di queste molecole sul taglio di APP-Gal4 indotto dal PDGF, le cellule HeLaAG, stabilmente esprimenti APP-Gal4, sono state trasfettate con vettori di espressione per Fe65, X11 α , mDab1, Jip1 o Shc e poi trattate o meno con PDGF-BB. Come mostrato in Fig.13, alcune di queste proteine hanno un significativo effetto sull'accumulo del CAT, sia in presenza che in assenza del trattamento con PDGF. L'overespressione di Fe65, per esempio, determina un accumulo di CAT che è più alto di quello precedentemente osservato dopo il trattamento con PDGF. L'esposizione al PDGF di cellule trasfettate con Fe65 provoca l'accumulo di livelli ancora più alti di CAT, ma più bassi di quelli attesi se l'accumulo di CAT dovuto al PDGF fosse semplicemente sommato a quello dovuto a Fe65 da solo. Al contrario, l'espressione di CAT in seguito a trattamento con PDGF in cellule HeLaAG trasfettate con X11 α è sensibilmente più bassa di quella osservata in cellule non overesprimenti X11. Sebbene poi né mDab1 né Jip1 abbiano effetti evidenti sul taglio di APP-Gal4 indotto dal PDGF, le conseguenze della trasfezione di Shc sono drammatiche. Infatti, i livelli di CAT raggiunti in cellule trasfettate con Shc sono 2 volte più alti di quelli osservati in cellule trasfettate con il vettore vuoto ed esposte al PDGF. Quindi il PDGF e Shc sembrano agire cooperativamente, considerato i livelli molto alti di CAT misurati quando cellule trasfettate con Shc sono esposte al PDGF.

Entrambe le isoforme di Fe65, Fe65L1 e Fe65L2, sono in grado di indurre un significativo accumulo di CAT nelle HeLaAG.

Nei mammiferi esistono 2 isoforme della proteina Fe65, chiamate Fe65 L1 ed Fe65L2. Allo scopo di valutare se anche queste 2 isoforme conservassero la capacità di indurre il taglio di APP-Gal4 così come Fe65, cellule HeLaAG sono state cotrasfettate con il vettore G5BCAT e con i vettori di espressione per Fe65, Fe65L1 o Fe65L2 e sono state esposte o meno a 40ng/ml di PDGF-BB umano ricombinante. Come si può vedere dalla Fig.14, sia l'overespressione di Fe65L1 che quella di Fe65L2 determina un significativo accumulo di CAT nelle HeLaAG, così come avviene per l'overespressione di Fe65 in presenza o meno del trattamento con PDGF.

Il dominio PTB2 di Fe65 e' necessario e sufficiente per indurre un accumulo di CAT nelle HeLaAG

A questo punto si e' deciso di studiare quali fossero gli effetti di Fe65 sull'induzione del taglio di APP-Gal4 e se questi effetti fossero dovuti all'interazione di Fe65 con APP. A questo scopo, cellule HeLaAG sono state trasfettate con le forme mutanti di Fe65, mancanti del dominio PTB2, che e' coinvolto nell'interazione con APP, oppure portanti mutazioni puntiformi nel dominio PTB2 (C655F), che previene la formazione del complesso Fe65-APP (Duilio et al., 1998) . Una rappresentazione schematica di queste proteine e dei loro domini e' data nella Fig. 15 A. Tali proteine mutanti erano completamente prive di attivita', come dimostrato dal fatto che non c'e' accumulo di CAT dopo la loro trasfezione. Inoltre il trattamento con PDGF ha lo stesso effetto in cellule HeLaAG trasfettate con il vettore vuoto ed in cellule trasfettate con le forme mutanti di Fe65, suggerendo cosi che non ci sono effetti dominanti negativi di queste proteine mutanti nella via attivata dal PDGF (vedi Fig.15B).

Fe65 induce il taglio di APP-Gal4 attraverso un meccanismo diverso da quello indotto dal PDGF

L'osservazione che gli effetti di Fe65 e quelli del PDGF non sono cooperativi suggerisce che Fe65 potrebbe indurre il taglio di APP-Gal4 attraverso un meccanismo diverso da quello attivato dal PDGF. Questa possibilità è supportata dall'analisi degli effetti del trattamento con PDGF o dell'overespressione di Fe65 sul taglio di forme mutanti di APP-Gal4, portanti mutazioni puntiformi nel motivo YENPTY. Infatti come mostrato in Fig.16, la mutazione del residuo di Tyr in posizione 682, che è noto prevenire il legame con Fe65, abolisce completamente gli effetti dell'overespressione di Fe65, mentre mutazioni dell'Asn in posizione 684 e della Tyr in posizione 687, che sono compatibili con la formazione del complesso Fe65-APP, non hanno effetti sul taglio indotto da Fe65 (Duilio et al., 1998). Al contrario, la mutazione della Tyr in posizione 682 non influenza il taglio indotto dal PDGF, mentre la mutazione dell'Asn in posizione 684 abolisce completamente il taglio di APP-Gal4 provocato dal PDGF.

Il taglio di APP Gal4 indotto da Fe65 e' indipendente dall'attivita' della γ secretasi, mentre e' dipendente dall'attivita' della caspasi 3

Come e' gia' stato dimostrato, il taglio di APP-Gal4 indotto dal PDGF e' completamente prevenuto dal trattamento delle cellule con l'inibitore di γ secretasi. Ci si e' chiesto quindi se tale inibitore fosse in grado di prevenire anche gli effetti di Fe65 sul taglio di APP-Gal4. A questo scopo cellule HeLa sono state transientemente trasfettate con APP-Gal4 ed Fe65, ed il trattamento con questo inibitore non mostra nessun effetto significativo (vedi Fig.17A). Questi risultati suggeriscono che il principale meccanismo responsabile degli effetti dell'overespressione di Fe65 sul taglio di APP-Gal4 non dipende dall'attivita' della γ secretasi. Un altro possibile meccanismo attraverso il quale Fe65 potrebbe indurre il rilascio di AID-Gal4 dalla membrana e' il taglio del dominio citosolico di APP da parte delle caspasi (Weidemann et al., 1999). Infatti e' stato dimostrato che numerose caspasi sono in grado di tagliare APP tra l'Asp 664 e l'Ala 665. Sulla base di questa considerazione, e' stato generato il mutante di APP-Gal4 nel quale l'Asp 664 e' mutato in un residuo di Asn e tale mutante e' stato poi co-trasfettato in cellule HeLa con Fe65. Come si puo' notare in Fig.17A, la mutazione del sito di taglio per la caspasi su APP-Gal4 e' in grado di inibire significativamente l'accumulo di CAT provocato dall'overespressione di Fe65. La capacita' residua di Fe65 di indurre il taglio della forma mutante (D664N) di APP-Gal4 e' bloccata dall'inibitore di γ secretasi, indicando cosi che Fe65 puo' anche indurre il taglio di APP-Gal4 attraverso un meccanismo dipendente da γ secretasi solo quando il taglio diretto dalle caspasi e' bloccato. In accordo con questi risultati abbiamo osservato che l'inibitore di caspasi-3, Z-DEVD-fmk, e' in grado di inibire l'accumulo di CAT indotto da Fe65, mentre il trattamento con questo inibitore non ha nessun effetto sul taglio di APP-Gal4 indotto dal PDGF (vedi Fig.17B).

Ci sono diversi risultati che indicano che il taglio del dominio citosolico di APP mediato dalle caspasi avviene in differenti condizioni sperimentali e che il solo accumulo di APP induce l'attivazione della caspasi-3 in cellule neuronali. In cellule HeLaAG non e' stato osservato alcuna induzione delle caspasi, mentre la contemporanea espressione di APP-Gal4 ed Fe65 e' accompagnata dall'attivazione della caspasi-3 (vedi Fig.17C). L'analisi al FACS ha escluso inoltre la possibilita' che l'overespressione di Fe65 possa indurre apoptosi nelle HeLaAG e questo e' in accordo con l'assenza in queste cellule del taglio della poly (ADP-riboso) polimerasi (dati non mostrati).

Shc induce il taglio di APP-Gal4 nelle HeLa AG in maniera γ secretasica dipendente, come il PDGF, agendo nel suo stesso pathway, ed in modo indipendente dall'attivita' della caspasi 3

Come mostrato precedentemente, l'overespressione di Shc nelle HeLaAG causa un grosso aumento di CAT, ed il contemporaneo trattamento con PDGF di cellule trasfettate con Shc determina un effetto cooperativo, portando ad un drammatico accumulo di CAT. Questa osservazione suggerisce che Shc ed il PDGF agiscono attraverso lo stesso meccanismo, e questa possibilita' e' fortemente supportata dai risultati della co-trasfezione di Shc con i costrutti APP-Gal4 mutanti, mostrati in Fig.18 A. Infatti solo il mutante di APP-Gal4, nel quale l'Asn 684 e' cambiata in Ala non e' responsivo alla trasfezione di Shc, con e senza il trattamento con PDGF, mostrando in questo modo un comportamento identico a quello osservato nell'esperimento a cui la Fig.16 fa riferimento. Inoltre gli effetti di Shc sono prevenuti dal trattamento delle HeLaAG con l'inibitore di γ secretasi (vedi Fig.18B) e non dal trattamento con l'inibitore delle caspasi Z-VEDV-fmk, che invece inibisce gli effetti dell'overespressione di Fe65 sul taglio di APP-Gal4.

In questo lavoro di tesi e' gia' stato precedentemente dimostrato che il PDGF induce il taglio di APP attraverso un meccanismo che include Src e Rac. Allo scopo di valutare se anche Shc faccia parte di questa via, cellule HeLaAG sono state co-trasfettate con Shc e con le forme costitutivamente attive di Src e Rac1 (SrcYF e RacQL) o anche con i loro dominanti negativi (SrcYFKM e RacN17). Come mostrato in Fig.18C, SrcYF e RacQL agiscono cooperativamente a Shc, mimando il comportamento del PDGF, mentre la trasfezione di Shc con le due forme dominanti negative di Src e Rac1 determina una forte inibizione degli effetti di Shc sul taglio di APP-Gal4. Una inibizione molto simile e' stata anche osservata in cellule HeLaAG trasfettate con Shc e trattate con l'inibitore del PDGF-R, AG1296, a dimostrazione che Shc ed il PDGF inducono il taglio di APP-Gal4 agendo attraverso lo stesso meccanismo.

E' stato anche dimostrato in precedenza che il PDGF e Src attivano il taglio di APP attraverso l'azione consecutiva della β e della γ secretasi. Di conseguenza, per dar supporto alla scoperta che Shc attiva il taglio di APP attraverso la stessa via del PDGF e di Src, sono stati misurati i livelli del peptide A β nel mezzo di crescita di cellule HEK293 trasfettate con APP695 e/o Shc o Fe65 o la forma costitutivamente attiva di Src (SrcYF). Come mostrato in Fig.18D, la trasfezione di Shc induce un significativo accumulo di A β , simile a quello osservato in cellule esprimenti SrcYF, mentre l'aumento modesto osservato dopo la trasfezione con Fe65 non e' considerato significativo.

DISCUSSIONE

Come è stato già accennato in precedenza, nonostante tanti anni di intenso studio, la regolazione della maturazione proteolitica di APP e della conseguente generazione del peptide β -amiloide rimane ancora oscura. Gli unici dati disponibili in letteratura sulla regolazione della maturazione di APP riguardano la secrezione di APPs (Mills et al., 1999). È stato infatti dimostrato che l'attivazione di recettori muscarinici induce un'aumentata secrezione di APPs, e fenomeni simili sono stati poi documentati anche per i recettori del glutammato metabotropi (Lee et al., 1995) o per i recettori serotoninergici (Nitsch et al., 1996). Tali effetti sono dipendenti dall'attività della protein chinasi C (PKC) (Mills et al., 1999); allo stesso tempo, poco si sa dei possibili effetti dell'attivazione dei recettori a tirosin chinasi sulla maturazione proteolitica di APP (Buxbaum et al., 1996; Hung et al., 1990). I risultati riportati in questo lavoro di tesi hanno portato all'isolamento, dal mezzo condizionato di cellule di glioma di ratto C6, di una molecola, il fattore di crescita derivante dalle piastrine PDGF, in grado di indurre la maturazione proteolitica della proteina di fusione APP-Gal4 in cellule HeLa stabilmente esprimenti tale proteina transmembrana. Ho dimostrato che l'induzione del taglio di APP-Gal4 è dipendente dall'attività dell'enzima γ -secretasi, in quanto abolito da un inibitore di questo enzima, ed è una conseguenza dell'attivazione del pathway a valle del recettore del PDGF, PDGF-R. Tale pathway include la tirosin chinasi non recettoriale Src e la piccola proteina legante il GTP, Rac1. Questi dati sono allo stesso tempo stati confermati dall'osservazione che, in cellule stabilmente esprimenti APP, la forma costitutivamente attiva di Src aumenta la produzione di A β nel mezzo di crescita, e che tale generazione è inibita nelle stesse condizioni trattando le cellule con l'inibitore di Src PP2.

Il PDGF-R, Src e Rac, sebbene abbastanza espresse in differenti linee cellulari, hanno un ruolo fondamentale nel sistema nervoso. È stato infatti chiaramente mostrato che il recettore α del PDGF è espresso nei neuroni in diverse zone del CNS di topo e di ratto (Oumesmar et al., 1999). Il PDGF-A e -B sono costitutivamente espressi in neuroni in vivo (della famiglia di Yeh et al., 1991), suggerendo che questi fattori di crescita, che regolano la proliferazione e la differenziazione degli oligodendrociti, possano anche avere specifiche funzioni negli stessi neuroni. Anche Src, ed altre tirosin chinasi della stessa famiglia come Fyn, sono espresse nei neuroni, particolarmente a livello dei coni di crescita ed sono state dimostrate essere coinvolte in diverse funzioni neuronali (Maness et al. 1988). Ben 3 membri Rho (Rho, Rac1 e Cdc42) sono coinvolti in diversi sistemi, tra i quali il sistema nervoso, nella regolazione della riorganizzazione dell'actina citoscheletrica (Hall et al., 2000). Il loro coinvolgimento nella regolazione di alcune funzioni neuronali è stato ormai ben documentato (Nikolic et al., 2002); in particolare, Rac1 è stato coinvolto nel processo crescita neuritica ed assonale, in quanto è stato dimostrato che l'espressione della forma costitutivamente attiva di Rac1 nelle cellule di Purkinje

determina lo sviluppo di un fenotipo atossico in topi, accompagnato da alterazioni delle spine dendritiche (Luo et al., 1996). Inoltre, uno degli effettori a valle di Rac1, Cdk5 (Nikolic et al., 1998), rappresenta una delle due chinasi responsabili dell'iperfosforilazione della proteina Tau, la proteina che lega i microtubuli, che quando è iperfosforilata precipita, formando i filamenti elicoidali presenti negli aggregati neurofibrillari, che, insieme alle placche amiloidi, rappresenta un segno patognomonico della malattia di Alzheimer.

Sicuramente questi risultati supportano anche l'ipotesi che ci possano essere altri segnali extracellulari, diversi dal PDGF, che, attraverso l'attivazione di Src e Rac1 possano indurre la maturazione proteolitica di APP. Difatti differenti vie di traduzione del segnale utilizzano Src come molecola trasduttore del segnale, come, per esempio, diversi recettori a tirosin chinasi (il recettore per l'NGF, per l'EGF e per l'FGF) (Kremer et al., 1991; Weernink et al., 1995), diverse integrine (durante l'interazione di cellule con proteine della matrice extracellulare) (Kaplan et al., 1995), recettori accoppiati a proteine G e canali di membrana attivati dal voltaggio o dai ligandi (Yu et al., 1998).

In questo lavoro di tesi ho analizzato le caratteristiche strutturali necessarie per APP per essere soggetto all'induzione taglio da parte dei suoi enzimi maturativi in seguito al trattamento con PDGF. Anche se sorprendentemente il dominio extracellulare sembra non avere alcun ruolo in tale processo, il motivo YENPTY presente nella coda citosolica di APP sembra essere assolutamente necessario per APP per essere metabolizzato in seguito al trattamento con PDGF. Di conseguenza, ho analizzato il ruolo dei ligandi di tale motivo del dominio citosolico di APP nella sua maturazione proteolitica, dimostrando che la trasfezione di Fe65 e Shc induce un drammatico aumento del taglio di APP-Gal4 in seguito a esposizione a PDGF, mentre l'overespressione di X11 α ha un effetto inibitorio sulla maturazione di APP indotta dal PDGF. L'analisi poi dei mutanti puntiformi di APP-Gal4 ha portato a risultati ancora piú interessanti: la mutazione del residuo di Asn684 determina una completa abolizione del taglio di APP indotto dal PDGF, rendendo APP insensibile anche alla sua maturazione indotta da Shc, confermando l'ipotesi che Shc agisce nello stesso pathway attivato dal PDGF; la mutazione del residuo di Tyr682, che invece previene il legame di Fe65 ad APP, rende APP insensibile al taglio indotto da Fe65, ma non ha nessun effetto sul taglio di APP indotto dal PDGF e Shc, suggerendo l'ipotesi che il PDGF ed Fe65 inducono la maturazione proteolitica di APP mediante 2 diversi meccanismi. Tale ipotesi è stata ulteriormente dimostrata poi quando ho mostrato che il taglio di APP indotto da Fe65 non è dipendente dall'attività di γ -secretasi (come quello indotto dal PDGF), ma è dipendente dall'attività di caspasi-3, che già precedentemente era stata dimostrata in grado di tagliare il dominio citosolico di APP a livello dell'Asp664.

I risultati qui riportati, infine, sono anche in accordo con dati recenti che dimostrano che l'inibitore delle attività tirosin chinasiche Gleevec, oggi utilizzato in clinica per il trattamento di alcune leucemie, previene la produzione di A β sia in cellule in coltura che in animali, senza alterare il metabolismo di altri substrati di γ -secretasi, come Notch (Netzer et al., 2003). Infatti è stato dimostrato in questa tesi che

l'inibizione del pathway attivato dal PDGF, mediante l'uso di inibitori per il PDGF-R e Src, non ha alcun effetto sul metabolismo di Notch. Tutti questi risultati supportano quindi la possibilità che nuove strategie terapeutiche basate su una inibizione più mirata delle attività tirosin chinasiche possano essere sviluppate allo scopo di inibire specificamente la maturazione di APP e la generazione di A β .

RINGRAZIAMENTI

Sono a conoscenza del fatto che la parte dedicata ai ringraziamenti di una tesi di dottorato ne rappresenta una sezione importante. Se possibile, nel mio caso, ne rappresenta forse una delle sezioni piu' importanti, ragion per cui mi scuso in anticipo se nello scrivere questa parte sarò piu' prolisso del dovuto.

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi di dottorato.

Vorrei ringraziare in primo luogo il professore Tommaso Russo, il mio docente guida durante questi anni di dottorato, della cui esperienza come scienziato mi sono giovato per i miei studi, e dei cui consigli paterni farò sempre uso nella vita. Dimostrandosi piu' un padre che non un supervisore, il professore Russo mi ha inoltre concesso l'onore ed il privilegio di svolgere, durante il periodo del mio dottorato di ricerca, anche uno stage di 2 anni negli Stati Uniti nel prestigioso laboratorio del professor Micheal Geoff Rosenfeld, presso l'Universita' della California di San Diego.

Vorrei poi ringraziare tutti gli amici e colleghi con cui ho avuto il piacere di lavorare fianco a fianco nel laboratorio del prof. Russo, e che fanno di tale laboratorio, non solo un luogo scientificamente molto valido e stimolante, ma anche un posto di lavoro con un'atmosfera amichevole e quindi produttiva: Nicola, Giusy, Paola, Marida, Francesca, Fabiana, Floriana, Marianna, Antonietta, Rosario e Rowena. Un grazie particolare tra queste persone va a Francesca, Marida e Fabiana, dimostratesi, oltre che valide collaboratrici, anche ineguagliabili amiche, che, anche durante gli anni dell'esperienza americana, hanno avuto la perseveranza di scrivermi, e di starmi vicino, nonostante le molte miglia di distanza. Un ringraziamento affettuoso anche a Nicola Zambrano, il mio supervisore durante il periodo della mia tesi di laurea, per avermi continuato a supportare nel tempo sia da un punto di vista umano che professionale.

Per quanto riguarda invece l'esperienza americana, voglio ringraziare naturalmente il prof. Micheal Geoff Rosenfeld che mi ha ospitato nel suo laboratorio e che con "quotidiani" meetings, discussioni ed insegnamenti ha contribuito a fare di me un aspirante scienziato. All'interno del suo molto popolato laboratorio ricordo con piacere Antonia, Tina, Eliot, Michele, Vivek, Puc, Anna, Valentina, Claudio, Tian, Bong-Gun e tanti altri che per periodi brevi o più lunghi mi sono stati vicini in questi anni di stage. In particolare ringrazio Anna e Valentina per avermi aiutato soprattutto all'inizio nella vita quotidiana in laboratorio e per avermi svelato ogni possibile "tip" con il protocollo della chromatin-immunoprecipitation.

"Devo" ringraziare il gruppo degli "italiani" incontrati a San Diego: Paola, Michela, Marco, Davide, Alessandra, Andrea, Antonella, Luisa, Giacomo, Raffaele, Ilenia, praticamente persone che, come me, si sono trovate a vivere un'esperienza di vita unica e che con me hanno condiviso ansie, gioie, problemi linguistici e tanto altro.

Vorrei poi ringraziare, se possibile, tutte le persone non italiane che ho avuto la gioia di conoscere durante gli anni "san dieghesi" al di fuori del laboratorio, le quali nonostante le diversita' culturali, hanno contribuito alla mia crescita personale come uomo. Parlo in particolar modo di Madeline, Babak, Eve, Claudia, Gladys, Cirenea,

Laila; continuare con una lista di nomi sarebbe impossibile per questioni di spazio e riduttivo; mi piace solo ricordare che tali persone rappresentano per me un arricchimento personale, un patrimonio umano e di amici che porterò per sempre con me: sono l'esempio vivente di come le diversità debbano essere una spinta verso l'unione anziché verso la separazione.

Un grazie di cuore va poi agli amici di sempre, quelli che sia durante gli anni "napoletani" che quelli "san dieghesi" mi hanno fatto sentire il loro appoggio ed affetto incondizionato: Luca, Gianluca, Marika, Diego, Alessandro, esempi di come la vera amicizia sia possibile anche quando le distanze diventano siderali.

Per concludere vorrei ringraziare le persone che più di tutte hanno contribuito alla mia formazione come uomo e come scienziato, attribuendo fin da quando ero un bambino un valore fondamentale alla mia educazione e formazione: sto parlando della mia famiglia, di mia madre, di mio padre (i cui sforzi per insegnarmi qualche parola di inglese da bambino ricorderò sempre), di mio fratello Christian (alla cui tesi di laurea mi avrebbe fatto enormemente piacere assistere), di mia nonna (che nonostante l'età ha cercato di mantenere con me un rapporto di cui mi sono giovato), dei miei cugini Paolo e Francesco. In particolar modo desidero ringraziare mia madre che, telefonandomi svariate volte al giorno ininterrottamente per 2 anni e consigliandomi sempre per il mio bene, ha mantenuto con me un rapporto capace di cancellare le distanze che ci separano, a dimostrazione di quanto possa fare l'amore di una madre e per una madre.

LEGENDE FIGURE

Fig. 1

Schema della struttura di APP e della sua maturazione proteolitica.

Nella figura è mostrata la struttura schematica della proteina APP. Si nota il piccolo dominio citosolico, un tratto transmembrana, ed una grossa regione extracellulare/intraluminale. È riportato lo schema degli eventi proteolitici coinvolti nella maturazione di APP. Il taglio dell' α -secretasi avviene all'interno della sequenza del peptide β -amiloide (indicato in viola scuro) e rilascia una porzione di APP solubile (sAPP α ed un frammento, C83, che diviene substrato di γ -secretasi, generando il frammento p3 ed un corto frammento C-terminale (AICD); l'azione combinata di β - e γ -secretasi è, invece, responsabile del rilascio del peptide β -amiloide, di AICD e una porzione di APP solubile (sAPP β) più corta. APP può essere anche substrato di caspasi: tale taglio genera il peptide C31.

Fig. 2

La rete di interazioni proteina-proteina centrate attorno al dominio citosolico del precursore del peptide β -amiloide dell'Alzheimer (APP). Al centro della figura è riportata la struttura primaria della coda citosolica di APP con il motivo YENPTY in evidenza. Sono schematizzate le proteine che interagiscono con tale regione. E' indicato il residuo di tirosina fosforilato dalla tirosina kinasi non recettoriali Abl, e che lega la stessa Abl e Shc.

Fig. 3

Struttura schematica dei membri della famiglia multigenica di Fe65 . Nella figura è riportata la struttura di Fe65 e quella delle proteine correlate Fe65L1 e Fe65L2. Sono indicate le regioni corrispondenti ai tre domini di interazione proteina-proteina (WW, PTB1 e PTB2). Sono indicati, inoltre, i ligandi dei tre domini: SET, Abl e Mena per WW; LSF, LRP e Tip60 per PTB1; APP per PTB2.

Fig. 4

Isolamento e caratterizzazione di cloni di HeLa stabilmente esprimenti la proteina di fusione APP-Gal4.

A. Una rappresentazione schematica del sistema sperimentale: la proteina di fusione APP-Gal4 e' tagliata dagli enzimi β - e γ -secretasi, determinando il rilascio di Gal4 dalla membrana fuso al dominio intracellulare di APP (AID). Questa proteina, detta AID-Gal4 puo' in tal modo attivare la trascrizione del gene CAT clonato a valle dei 5 elementi in cis regolatori del promotore di Gal4 nel vettore reporter G5BCAT.

B. Analisi dei lisati di cellule HeLa trasfettate con il vettore di espressione di APP695 umano o di Gal4 e di 2 pools di cloni di HeLa (HeLaAG1-8, HeLaAG9-14) stabilmente esprimenti la proteina di fusione APP-Gal4. Nei 2 Western blot sono stati utilizzati rispettivamente l'anticorpo 6E10 che riconosce il dominio extracellulare di APP, ed un anticorpo anti Gal4. Un asterisco indica le bande di APP selvatico, 2 asterischi indicano le bande di APP-Gal4, mentre la freccia indica le bande di Gal4 selvatico.

C. Cellule HeLaAG trasfettate con il vettore G5BCAT sono state co-coltivate sia con cellule NIH3T3 che con cellule C6 oppure co-coltivate in presenza del mezzo condizionato di queste linee cellulari. Nelle co-culture, le cellule sono state piastrate alla densita' indicata, raccolte 72ore dopo ed e' stato misurato l'accumulo di CAT nei loro estratti cellulari. I mezzi condizionati da colture di 72 ore delle cellule indicate sono stati aggiunti a 2.5×10^5 cellule HeLaAG. E' stato poi misurato l'accumulo di CAT in estratti da cellule raccolte 48 ore dopo l'esposizione a mezzo condizionato. Sono riportate le deviazioni standard di esperimenti in triplicato.

Fig. 5

Purificazione dell'attività presente nel mezzo condizionato delle C6 che induce l'espressione di CAT nelle cellule HeLaAG

A. 3 litri di mezzo condizionato delle C6 è stato concentrato e frazionato tramite precipitazione con ammonio solfato. Le frazioni ottenute con una saturazione di sale del 40, 70 o 100% sono state dializzate e saggiate per la loro capacità di indurre accumulo di CAT nelle HeLaAG trasfettate con il vettore G5BCAT. Le concentrazioni dei campioni saggiati erano: 40%AS, 5 μ g/ml, 70%AS, 200 μ g/ml, 100%AS, 200 μ g/ml. Sono riportate le deviazioni standard di esperimenti in triplicato.

B. Le frazioni di AS40% sono state applicate su una colonna Sephadex G-75 e cromatografate tramite FPLC. Frazioni di 400 μ l sono state eluite e saggiate per la loro capacità di indurre accumulo di CAT in cellule HeLaAG. La calibrazione della colonna con molecole di peso molecolare noto indicano che i 2 picchi di attività erano eluiti rispettivamente come proteine di 70 e 30kDa.

C. Le frazioni eluite dalla Sephadex contenenti (7 e 23) o non contenenti (9, 11 e 20) l'attività sono state concentrate e sottoposte ad elettroforesi e poi il gel colorato con la tecnica del Silver staining. La freccia indica una banda di circa 15kDa presente nelle frazioni contenenti attività.

D. Le frazioni contenenti attività (7-8 e 23-24) o non contenenti attività (3-4, 10-11, 14-16, 17-18, 19-20, 21-22, 25-27) sono state sottoposte a SDS-PAGE e poi il filtro è stato incubato con un anticorpo anti-PDGF, confermando così l'identificazione effettuata tramite spettrometria di massa.

Fig. 6

Il PDGF-BB contenuto nel mezzo condizionato delle C6 induce accumulo di CAT nelle cellule HeLaAG.

Cellule HeLaAG transfettate con il vettore G5BCAT sono state esposte a 40ng/ml di PDGF-BB ricombinante oppure a 10µg/ml di frazione di AS40% per 24 ore prima di essere raccolte. Nelle stesse condizioni le cellule sono state anche esposte, come indicato, a 30µM di genisteina o a 2µM di AG1296, che sono rispettivamente un inibitore generale delle tirosin chinasi ed un inibitore specifico del PDGF-R. Per accertare se la frazione AS40% contiene anche altri fattori, oltre al PDGF-BB, che attivano l'espressione del CAT, tale frazione e' stata immunodepleta con un anticorpo anti-PDGF e con IgG di topo di controllo e le cellule HeLaAG sono state trattate con queste misture. Sono riportate di seguito le deviazioni standard di esperimenti in triplicato.

Fig. 7

L'accumulo di CAT indotto nelle cellule HeLaAG dal PDGF dipende specificamente dal taglio di APP-Gal4.

A. Cellule HeLa selvatiche sono state trasfettate con il vettore G5BCAT e con il vettore di espressione di Gal4, e trattate con 40ng/ml di PDGF ricombinante o con 10µg/ml della frazione 40%AS per 24 ore prima di essere raccolte. La quantità di CAT è stata misurata in esperimenti in triplicato e sono riportate le deviazioni standard.

B. Estratti cellulari di cellule HeLaAG trattate o meno per 48 ore con 40%AS o con PDGF-BB sono state sottoposte ad SDS-PAGE ed analizzate per Western blot con l'anticorpo CT695, che riconosce il dominio citosolico di APP, con l'anticorpo 6E10, che ne riconosce il dominio extracellulare, e con l'anticorpo anti-Gal4. Questo dimostra che l'esposizione delle HeLaAG a 40%AS o a PDGF-BB determina un cambiamento nella dimensione delle bande di APP-Gal4 verso una banda maggiore di dimensione di circa 100kDa, simile a quella del Gal4 selvatico (indicata da una freccia), e riconosciuta sia dall'anticorpo anti-Gal4 che dal CT695. Al contrario, l'anticorpo 6E10 non è in grado di riconoscere la forma tagliata della proteina, dimostrando in tal modo di non contenere l'epitopo N-terminale del peptide β amiloide. L'asterisco indica le bande di APP-Gal4.

Fig. 8

Src e Rac1 sono gli effettori del meccanismo con cui il PDGF induce il taglio proteolitico di APP-Gal4 nelle HeLaAG.

A. Cellule HeLaAG transientemente trasfettate con il vettore G5BCAT sono trattate con 40ng/ml di PDGf-BB ricombinante oppure con 10µg/ml della frazione di AS40%. Queste cellule sono anche trattate, per 24 ore prima di essere raccolte, con 100µM dell'inibitore delle ERKs (PD098059), 100nM dell'inibitore di PI3K (wortmannina), 10µM dell'inibitore di Src (PP2), oppure con un composto correlato (PP3) incapace di inibire Src. Sono riportate le deviazioni standard di esperimenti in triplicato.

B. Cellule HeLaAG transientemente co-trasfettate con il vettore G5BCAT e con i vettori esprimenti i mutanti costitutivamente attivi di Src (SrcYF), Abl (Abl-PP), e Rac1 (RacQL), o con SrcYF e il mutante dominante negativo di Rac1 (RacN17). Dove indicato, le cellule HeLaAG sono state transientemente trasfettate con i mutanti dominanti negativi di Src (SrcYFKM) o di Rac1 (RacN17) e trattate con PDGF-BB o con la frazione di AS40%, per 24 ore prima di essere raccolte.

Fig. 9

Gli accumuli di CAT indotti dal trattamento con PDGF e dalle trasfezioni con SrcYF o RacQL sono dipendenti dall'attività della γ secretasi.

A. Cellule HeLaAG sono state trasfettate con il vettore G5BCAT, esposte a PDGF-BB oppure alla frazione AS40%, e trattate con 10 μ M dell'inibitore della γ secretasi, il composto X, per 12 o 24 ore, come indicato.

B. Cellule HeLaAG transientemente co-trasfettate con il vettore G5BCAT e con i vettori di espressione per SrcYF o RacQL sono trattate o meno con 10 μ M dell'inibitore di γ secretasi, composto X per 24 ore. Sono indicate le deviazioni standard di esperimenti in triplicato

Fig. 10

L'attività tirosin chinasi di Src regola la produzione di A β a partire da APP695 selvatico in cellule in coltura.

A. Cellule HEK293 sono state transientemente co-trasfettate con il vettore di espressione per APP695 con e senza il vettore di espressione per SrcYF. 36 e 48 ore dopo le trasfezioni, la quantità di A β totale presente nel mezzo è stata misurata tramite saggio ELISA. Nel caso del punto a 36 ore di cellule trasfettate con APP695 da solo, le misurazioni erano al di sotto del limite di misurazione (n.d. non-misurabile).

B. Cellule CHO stabilmente esprimenti APP695 sono state trattate con 5 e 20 μ M dell'inibitore di Src, PP2 e con 20 μ M di PP3. le barre indicano la quantità totale di a β presente nel mezzo dopo 1,2 e 12 ore. I valori sono medie di esperimenti in triplicato e sono riportate le deviazioni standard.

Fig. 11

Il dominio citosolico di APP e' necessario per il taglio di APP-Gal4 indotto dal PDGF.

A. Cellule HeLa sono state transientemente co-trasfettate con il vettore G5BCAT ed i vettori di espressione codificanti per le proteine di fusione APP-Gal4 portanti le indicate delezioni del dominio EC/IL di APP. 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate o meno per 24 ore con 40ng/ml di PDGF-BB ricombinante. La sequenza del dominio YENPTY e' sottolineata. Sono riportate le deviazioni standard di esperimenti in triplicato.

B. Cellule HeLa sono state trasfettate ed analizzate come in B per studiare i mutanti di delezione del dominio citosolico di APP. Nell'inserto c'e' il Western Blot delle tre proteine mutanti (688, 670 e 641) a dimostrazione che la loro espressione e' comparabile a quella della proteina APP-Gal4 selvatica (695).

Fig. 12

Il trattamento con PDGF non ha nessun effetto sul metabolismo di Notch.

Cellule HeLa sono state transientemente co-trasfettate con il vettore CBF1-Luc e con i vettori codificanti per Notch e per il suo mutante di delezione Notch ΔE . 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate o meno per 24 ore con 40ng/ml di PDGF-BB umano ricombinante, e, come indicato, con 2 μ M dell'inibitore del PDGF-R AG1296, 10 μ M dell'inibitore di Src PP2, o 10 μ M dell'inibitore della γ secretasi composto X. Le deviazioni standard di esperimenti in triplicato sono riportate.

Fig. 13

L'overespressione di Fe65, X11 e Shc influenza il taglio di APP-Gal4.

Le cellule HeLaAG, stabilmente esprimenti la proteina di fusione APP-Gal4, sono state trasfettate transientemente con il vettore G5BCAT e con i vettori di espressione di fe65, X11, mDab, Jip1 o Shc o con il vettore vuoto. 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate o meno con PDGF-BB ricombinante per altre 24 ore. Sono riportante le deviazioni standard di esperimenti i triplicato.

Fig. 14

Sia Fe65L1 che Fe65L2 conservano la capacità di Fe65 di indurre il taglio di APP-Gal4.

Cellule HeLaAG sono state co-trasfettate transientemente con G5BCAT e con i vettori di espressione per Fe65L1 ed Fe65L2. 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate o meno con PDGF-BB ricombinante per altre 24 ore. Sono riportate le deviazioni standard di esperimenti i triplicato.

Fig. 15

L'interazione di Fe65 con APP e' necessaria per la capacita' di Fe65 di indurre un accumulo di CAT nelle HeLaAG.

A. I costrutti usati nei seguenti esperimenti sono 2 mutanti di Fe65, C655F e Δ PTB2. Il mutante C655F porta una mutazione puntiforme della cisterna in posizione 655 mutata in fenilalanina, mentre il mutante Δ PTB2 presenta la delezione del dominio PTB2.

B. Cellule HeLaAG, stabilmente esprimenti la proteina APP-Gal4, sono state transientemente co-trasfettate con il plasmide G5BCAT e con i vettori di espressione per la forma selvatica di Fe65, oppure per le due forme mutanti C655F e Δ PTB2, incapaci di interagire con APP. 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate o meno con PDGF-BB ricombinante per altre 24 ore. Nell'inserto, c'e' il Western blot delle due forme mutanti di Fe65 usate, che dimostra che la loro espressione e' comparabile con quella di Fe65 selvatico (a, Fe65 selvatico; b, C655F; c, Δ PTB2)

Fig. 16

Il PDGF ed Fe65 inducono entrambi il taglio di APP-Gal4 ma con meccanismi diversi.

I costrutti usati nei seguenti esperimenti sono forme di APP-Gal4 portanti una mutazione puntiforme. Rispettivamente il mutante Y682G porta la Tyr in posizione 682 mutata in Gly, il mutante N684A porta l'Asn in posizione 684 mutata in Ala, mentre il mutante Y687A porta la Tyr in posizione 687 mutata in Ala. Cellule HeLa sono state trasfettate con G5BCAT ed APP-Gal4 oppure con i mutanti di APP-Gal4 Y682G, N684A ed Y687A. Le cellule sono state anche trasfettate con Fe65 e/o trattate con PDGF quando indicato. Nell'inserto c'è il Western blot delle 3 proteine mutanti di APP-Gal4 utilizzate, dimostrando così che la loro espressione è comparabile a quella di APP-Gal4 selvatico (d, APP-Gal4 selvatico; e, Y682G; f, N684A; g, Y687A). Sono riportate le deviazioni standard di misurazioni di CAT effettuate in triplicato.

Fig. 17

Il taglio di APP-Gal4 indotto da Fe65 e' dipendente dall'attivita' di caspasi-3.

A. Cellule HeLa sono state trasfettate con il vettore G5BCAT ed APP-Gal4 o il mutante APP-Gal4 D664N, con o senza il vettore di espressione di Fe65, in presenza o in assenza dell'inibitore di γ secretasi, il composto X.

B. Cellule HeLaAG esprimenti stabilmente la proteina di fusione APP-Gal4 sono state transientemente co-trasfettate con il plasmide G5BCAT, con o senza il vettore di espressione di Fe65. 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state esposte o meno al PDGF ricombinante per altre 24 ore in presenza o in assenza dell'inibitore delle caspasi Z-VEDV-fmk. Sono riportate in entrambi i pannelli le deviazioni standard di esperimenti in triplicato.

C. Western blot con l'anticorpo anti-caspasi-3 di estratti di cellule HeLa trasfettati con APP-Gal4 e con il vettore vuoto (canale 1), con Fe65 selvatico (canale 2), con Fe65 C655F (canale 3), o con Fe65 Δ PTB2 (canale 4). La freccia indica la forma tagliata della caspasi 3.

Fig. 18

Shc induce il taglio di APP-Gal4 agendo attraverso lo stesso meccanismo del PDGF.

A. Cellule HeLa sono state trasfettate con G5BCAT e APP-Gal4 i suoi mutanti APP-Gal4 Y682G, N684A, Y687A. Le cellule sono state anche trasfettate con il vettore di espressione di Shc e/o esposte a PDGF dove indicato.

B. Cellule HeLa sono state trasfettate con G5BCAT, APP-Gal4 e Shc e trattate o meno con l'inibitore di γ secretasi, composto X, o con l'inibitore di caspasi Z-VEDV-fmk.

C. Cellule HeLa sono state trasfettate con G5BCAT, APP-Gal4, e/o Shc e, dove indicato, con i vettori di espressione per le forme costitutivamente attive di Src (SrcYF) e Rac1 (RacQL) o con i mutanti dominanti negativi di queste due proteine (SrcYFKM e RacN17). Le ultime 2 barre indicano la quantità di CAT in cellule trasfettate con APP-Gal4 e con Shc e trattate con l'inibitore di Src, PP2, o con l'inibitore del PDGF-R, AG1296. Sono riportate le deviazioni standard di esperimenti in triplicato.

D. Cellule HEK293 sono state transientemente trasfettate con APP695 umano e con il vettore di espressione per Shc, o per Fe65 o per SrcYF, e la quantità di peptide A β è stata misurata nel loro mezzo di crescita.

BIBLIOGRAFIA

1. Annaert, W., and De Strooper, B. (2002). A Cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 18: 25-51
2. Ardivissov, A.K., et al., (1994). *Mol. Cell. Biol.* 14: 6715-6726
3. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-6.
4. Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S. and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 231-5.
5. Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110, 55-67.
6. Barila` , D., and Superti-Furga, G. (1998) *Nat. Genet.* **18**, 280–282
7. Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., Wen, P., Cui, W., Shioi, J., Koo, E., Ozawa, M., Friedrich, V. L., Jr. et al. (2001). Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2381-6.
8. Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M. G., Go, R. C., Vekrellis, K. et al. (2000). Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science* 290, 2302-3.
9. Bonfini, L., Migliaccio, E., Pelicci, G., Lanfrancone, L., Pelicci, PG., (1996). *Trends Biochem* 21: 257-261

10. Borg, J. P., Lopez-Figueroa, M. O., de Taddeo-Borg, M., Kroon, D. E., Turner, R. S., Watson, S. J. and Margolis, B. (1999). Molecular analysis of the X11-mLin-2/CASK complex in brain. *J Neurosci* 19, 1307-16.
11. Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E. and Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol* 16, 6229-41.
12. Borg, J. P., Yang, Y., De Taddeo-Borg, M., Margolis, B. and Turner, R. S. (1998). The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem* 273, 14761-6.
13. Bostrom, H., et al., (1996). *Cell* 85: 863-873
14. Bressler, S. L., Gray, M. D., Sopher, B. L., Hu, Q., Hearn, M. G., Pham, D. G., Dinulos, M. B., Fukuchi, K., Sisodia, S. S., Miller, M. A. et al. (1996). cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein. *Hum Mol Genet* 5, 1589-98.
15. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., Lebail, O., et al. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5: 207-16
16. Brown, MS., Ye, J., Rawson, RB., Goldstein, JL. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100: 391-98
17. Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., Hansen, U. and Russo, T. (2002). Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase expression. *J Biol Chem* 277, 35481-8.

18. Buxbaum, J. D., Gandy, S. E., Cicchetti, P., Ehrlich, M. E., Czernik, A. J., Fracasso, R. P., Ramabhadran, T. V., Unterbeck, A. J., and Greengard, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6003–6006
19. Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. and Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765-7.
20. Cam, J. A., Zerbinatti, C. V., Knisely, J. M., Hecimovic, S., Li, Y. and Bu, G. (2004). The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains beta-amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid-beta peptide production. *J Biol Chem* 279, 29639-46.
21. Cao, X. and Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-20.
22. Chiariello, M., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 580–586
23. Cortes, J. E., Talpaz, M. and Kantarjian, H. (1996). Chronic myelogenous leukemia: a review. *Am J Med* 100, 555-70.
24. De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.
25. De Strooper, B. and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 1857-70.
26. Dickson, D. W. (1997). Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* 18, S21-6.
27. Dodart, J.C., Bales, K. R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X. Holtzman, D.M. and Paul, S.M.

- (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neuroscience* 5 452-457
28. Duilio, A., Faraonio, R., Minopoli, G., Zambrano, N. and Russo, T. (1998). Fe65L2: a new member of the Fe65 protein family interacting with the intracellular domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Biochem J* 330 (Pt 1), 513-9.
29. Duilio, A., Zambrano, N., Mogavero, A. R., Ammendola, R., Cimino, F. and Russo, T. (1991). A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases. *Nucleic Acids Res* 19, 5269-74.
30. Ermekova, K. S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. and Sudol, M. (1997). The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J Biol Chem* 272, 32869-77.
31. Fantl, W.J., Escobedo, J.A., Martin, G.A., Turck, C.W., del Rosario, M., McCormick, F., Williams, L.T. (1992). *Cell* 69:413-423
32. Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A. and Russo, T. (1995). The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 270, 30853-6.
33. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C. et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3, 85-97.
34. Furtoss, O., Dorey, K., Simon, V., Barila` , D., Superti-Furga, G., and Roche, S. (2002) *EMBO J.* **21**, 514–524

35. Gandy, S. and Petanceska, S. (2000). Regulation of Alzheimer beta-amyloid precursor trafficking and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1502, 44-52.
36. Gao, Y. and Pimplikar, S. W. (2001). The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14979-84.
37. Gelderloos, J.A., Rosenkranz, K., Bazenet, C., Kazlauskas, A., (1998). *J. Biol. Chem.* 273: 5908-5915
38. Gertler, F. B., Comer, A. R., Juang, J. L., Ahern, S. M., Clark, M. J., Liebl, E. C. and Hoffmann, F. M. (1995). enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the Drosophila Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev* 9, 521-33.
39. Guenette, S. Y., Chen, J., Jondro, P. D. and Tanzi, R. E. (1996). Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10832-7.
40. Haass, C. (2004). Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *Embo J* 23, 483-8.
41. Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B. and Selkoe, D. J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021-4.
42. Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D. and Teplow, D. B. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-5.
43. Hall, A., and Nobes, C. D. (2000) *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **355**, 965–970

44. Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road of therapeutics. *Science* 297, 353-356
45. Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P. et al. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20, 7951-63.
46. Heldin, CH., (1997). simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. *Febs Letters* 410:17-21
47. Heldin, CH., and Ostman, A., (1996). *Cytokines Growth Factors Review* 7: 3-10
48. Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P., and Cooper, J.A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389: 733-737
49. Hirai, H., and Varmus, H. E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8592–8596
50. Hu, Q., Cool, B. H., Wang, B., Hearn, M. G. and Martin, G. M. (2002). A candidate molecular mechanism for the association of an intronic polymorphism of FE65 with resistance to very late onset dementia of the Alzheimer type. *Hum Mol Genet* 11, 465-75.
51. Hu, Q., Kukull, W. A., Bressler, S. L., Gray, M. D., Cam, J. A., Larson, E. B., Martin, G. M. and Deeb, S. S. (1998). The human FE65 gene: genomic structure and an intronic biallelic polymorphism associated with sporadic dementia of the Alzheimer type. *Hum Genet* 103, 295-303.
52. Hung, A. Y., Haass, C., Nitsch, R. M., Qiu, W. Q., Citron, M., Wurtman, R. J., Growdon, J. H., and Selkoe, D. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22959–22962

53. Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M. et al (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* 19, 419-427
54. Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A. and Goldstein, L. S. (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414, 643-8.
55. Kaplan, K. B., Swedlow, J. R., Morgan, D. O., and Varmus, H. E. (1995) *Genes Dev.* 9, 1505–1517
56. Kaplan, J.M., Mardon, G., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1988). The first 7 amino acids encoded by the v-src oncogene act as a myristylation signal: Lysine 7 is a critical determinant. *Mol Cell Biol* 8: 2435-2441
57. Kim, H. S., Kim, E. M., Lee, J. P., Park, C. H., Kim, S., Seo, J. H., Chang, K. A., Yu, E., Jeong, S. J., Chong, Y. H. et al. (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression. *Faseb J* 17, 1951-3.
58. Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guenette, S. Y. and Selkoe, D. J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276, 40288-92.
59. Kinoshita, A., Shah, T., Tangredi, M. M., Strickland, D. K. and Hyman, B. T. (2003). The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe65. *J Biol Chem* 278, 41182-8.
60. Kypta, R. M., Goldberg, Y., Ulug, E. T., and Courtneidge, S. A. (1990) *Cell* 62,481–492

61. Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. and Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530-2.
62. Knauer, M. F., Orlando, R. A. and Glabe, C. G. (1996). Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* 740, 6-14.
63. Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., and Nye, J. S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1683–1688
64. Kremer, N. E., D'Arcangelo, G., Thomas, S. M., De-Marco, M., Brugge, J. S., and Halegoua, S. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 809–818
65. Lambert, J. C., Goumidi, L., Vrieze, F. W., Frigard, B., Harris, J. M., Cummings, A., Coates, J., Pasquier, F., Cottel, D., Gaillac, M. et al. (2000). The transcriptional factor LBP-1c/CP2/LSF gene on chromosome 12 is a genetic determinant of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 9, 2275-80.
66. Lee, R. K. K., Wurtman, R. J., Cox, A. J., and Nitsch, R. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8083–8087
67. Lemere, C. A., Blusztajn, J. K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. C. and Selkoe, D. J. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis* 3, 16-32.
68. Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsoson, E., Betsholtz, C., (1994) *Genes Dev* 8, 1875-1887
69. Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, T., Tang, J., (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci* 97: 1456-60
70. Lu, D. C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R. F., Ellerby, L. M., Ye, X., Salvesen, G. S., Koo, E. H. and Bredesen, D. E. (2000). A second

- cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med* 6, 397-404.
- 71.Luo, L., Hensch, T. K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996) *Nature* **379**, 837–840
- 72.Luzi, L., Confalonieri, S., Di Fiore, P. P. and Pelicci, P. G. (2000). Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev* 10, 668-74.
- 73.Macias, M. J., Wiesner, S. and Sudol, M. (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* 513, 30-7.
- 74.Maness, P. F., Aubry, M., Shores, C. G., Frame, L., and Pfenniger, K. H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5001–5005
- 75.Mann, D. M., Yates, P. O., Marcyniuk, B. and Ravindra, C. R. (1986). The topography of plaques and tangles in Down's syndrome patients of different ages. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12, 447-57.
- 76.Margolis, B., Borg, J. P., Straight, S. and Meyer, D. (1999). The function of PTB domain proteins. *Kidney Int* 56, 1230-7.
- 77.Marshall, C.J., (1994). *Curr. Genet. Dev* 4: 82-89
- 78.Matsuda, S., Yasukawa, T., Homma, Y., Ito, Y., Niikura, T., Hiraki, T., Hirai, S., Ohno, S., Kita, Y., Kawasumi, M. et al. (2001). c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK. *J Neurosci* 21, 6597-607.
- 79.Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243-54.
- 80.Meyer, M. R., Tschanz, J. T., Norton, M. C., Welsh-Bohmer, K. A., Steffens, D. C., Wyse, B. W. and Breitner, J. C. (1998). APOE genotype

- predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet* 19, 321-2.
81. Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., Auricchio, F., (1996). *EMBO J.*, 15: 1292-1300
 82. Mills, J., and Reiner, P. B. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 443–460
 83. Mori, S., Ronnstrand, L., Yokote, K., Engstrom, A., Court-neidge, S.A., Claesson-Welsh, L., Heldin, C-H., (1993). *EMBO J.* 12: 2257-2264
 84. Mumm, JS., Schroeter, EH., Saxena, MT., Grisemer, A., Tian, XL., et al (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell* 5: 197-206
 85. Netzer, W. J., Dou, F., Cai, D., Veach, D., Jean, S., Li, Y., Bornmann, W. G., Clarkson, B., Xu, H., and Greengard, P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12444–12449
 86. Nikolic, M. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 731–745
 87. Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J., and Tsai, L. H. (1998) *Nature* **395**, 194–198
 88. Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H., and Wurtman, R. J. (1996) *J. Biol.Chem.* **271**, 4188–4194
 89. Oumesmar, B. N., Vignalis, L., and Baron-Van Evercooren, A. (1997) *J. Neurosci.*
 90. Panayotou, G., et al., (1996). Modular Texts in Molecular and Cell Biology: Signal trasduction, Vol 1 Chapman and Hall 189-204
 91. Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M. and D'Adamio, L. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis* 2, 289-301.

92. Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-22.
93. Pawson, T., (1995). *Nature* 373: 573-580
94. Pellman, D., Garber, E. A., Cross, F. R., and Hanafusa, H., (1985). fine structural mapping of a critical NH₂-terminal region of p60src. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 1623-1627
95. Perkinton, M. S., Standen, C. L., Lau, K. F., Kesavapany, S., Byers, H. L., Ward, M., McLoughlin, D. M. and Miller, C. C. (2004). The c-Abl tyrosine kinase phosphorylates the Fe65 adaptor protein to stimulate Fe65/amyloid precursor protein nuclear signaling. *J Biol Chem* 279, 22084-91.
96. Pietrzik, C. U., Yoon, I. S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S. and Koo, E. H. (2004). FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 24, 4259-65.
97. Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I. and Fuller, F. (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331, 525-7.
98. Powell, C. M., Rudge, T. L., Zhu, Q., Johnson, L. F. and Hansen, U. (2000). Inhibition of the mammalian transcription factor LSF induces S-phase-dependent apoptosis by downregulating thymidylate synthase expression. *Embo J* 19, 4665-75.
99. Ravichandran, K. S., (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20: 6322-6330
100. Ronnstrand, L., Mori, S., Arvisson, A.K., Eriksson, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H. (1992) *EMBO J.* 11, 3911-3919

101. Russo, C., Venezia, V., Repetto, E., Nizzari, M., Violani, E., Carlo, P., Schettini, G., (2004). The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications. *brain Research Reviews* 48: 257-264
102. Russo, C., Dolcini, V., Salis, S., Venezia, V., Zambrano, N., Russo, T. and Schettini, G. (2002). Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 277, 35282-8.
103. Russo, T., Faraonio, R., Minopoli, G., De Candia, P., De Renzis, S. and Zambrano, N. (1998). Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett* 434, 1-7.
104. Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J. M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., Oltersdorf, T. and Schenk, D. B. (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58, 615-22.
105. Scheinfeld, M. H., Roncarati, R., Vito, P., Lopez, P. A., Abdallah, M. and D'Adamio, L. (2002). Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 277, 3767-75.
106. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W. et al. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864-70.
107. Simeone, A., Duilio, A., Fiore, F., Acampora, D., De Felice, C., Faraonio, R., Paolocci, F., Cimino, F. and Russo, T. (1994). Expression of

- the neuron-specific FE65 gene marks the development of embryo ganglionic derivatives. *Dev Neurosci* 16, 53-60.
108. Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: Genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766
109. Snyder, M. A., Bishop, J. M., McGrath, J. P., and Levinson, A. D. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 1772-1779
110. St George-Hyslop, P.H. (2000). Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 47 183-199
111. Sumioka, A., Nagaishi, S., Yoshida, T., Anning, L., Miura, M., Sukuzi, T., (2005). Role of 14-3-3 gamma in Fe65-dependent gene transactivation mediated by the APP cytoplasmic fragment. *J. Biol. Chem* in press.
112. Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G. and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438-41.
113. Tarr, P. E., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P. G. and D'Adamio, L. (2002). Tyrosine phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with Shc. *J Biol Chem* 277, 16798-804.
114. Telese, F., Bruni, P., Donizetti, A., Gianni, D., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Zambrano, N., Rosenfeld, M. G. and Russo, T. (2004). Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep.*
115. Terry, R. D., Hansen, L. A., DeTeresa, R., Davies, P., Tobias, H. and Katzman, R. (1987). Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 46, 262-8.
116. Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B. and Herz, J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273, 33556-60.

117. Twamley-Stein, G.M., Pepperkok, R., Ansorge, W., and Courtneidge, S.A., (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci* 90 7696-7700
118. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R. et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-41.
119. von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18, 661-9.
120. Weernink, P. A., and Rijksen, G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2264–2267
121. Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Reinhard, F. B., Schuckert, O., Evin, G. and Masters, C. L. (1999). Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases. *J Biol Chem* 274, 5823-9.
122. Westermann, R., Hardung, M., Meyer, D. K., Ehrhard, P., Otten, U., and Unsicker, K. (1988) *J. Neurochem.* **50**, 1747–1758
123. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513-7.
124. Yeh, H. J., Ruit, K. G., Wang, Y. X., Parks, W. C., Snider, W. D., and Deuel, T. F. (1991) *Cell* **64**, 209–216
125. Yu, X. M, Askalan, R., Keil, G. J., and Salter, M. W. (1997) *Science* **275**, 674–678
126. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T. et al. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54.

127. Zambrano, N., Bruni, P., Minopoli, G., Mosca, R., Molino, D., Russo, C., Schettini, G., Sudol, M. and Russo, T. (2001). The beta-amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene. *J Biol Chem* 276, 19787-92.
128. Zambrano, N., Minopoli, G., de Candia, P. and Russo, T. (1998). The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem* 273, 20128-33.
129. Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S. and Conner, M. W. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525-31.

PUBBLICAZIONI

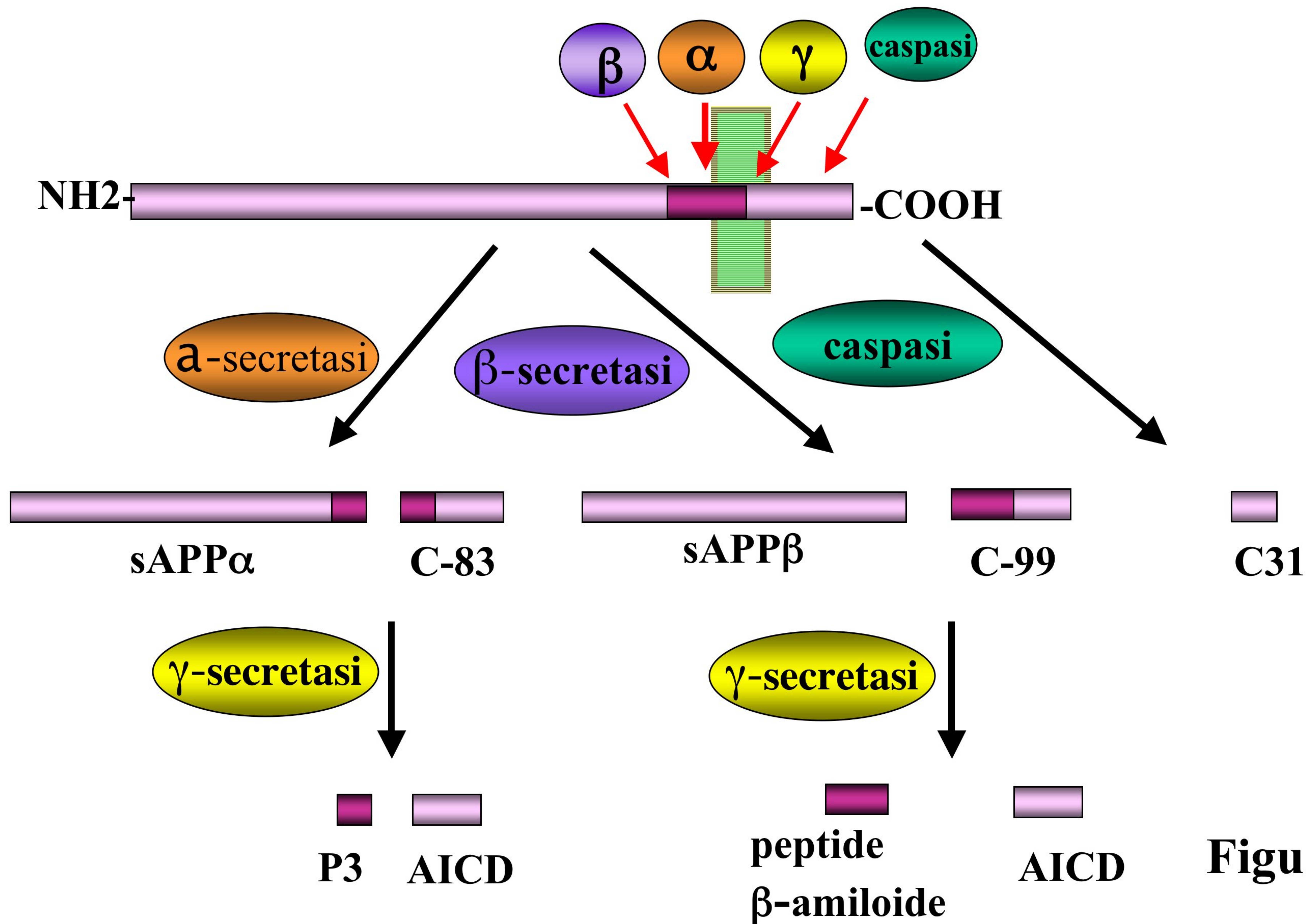


Figura 1

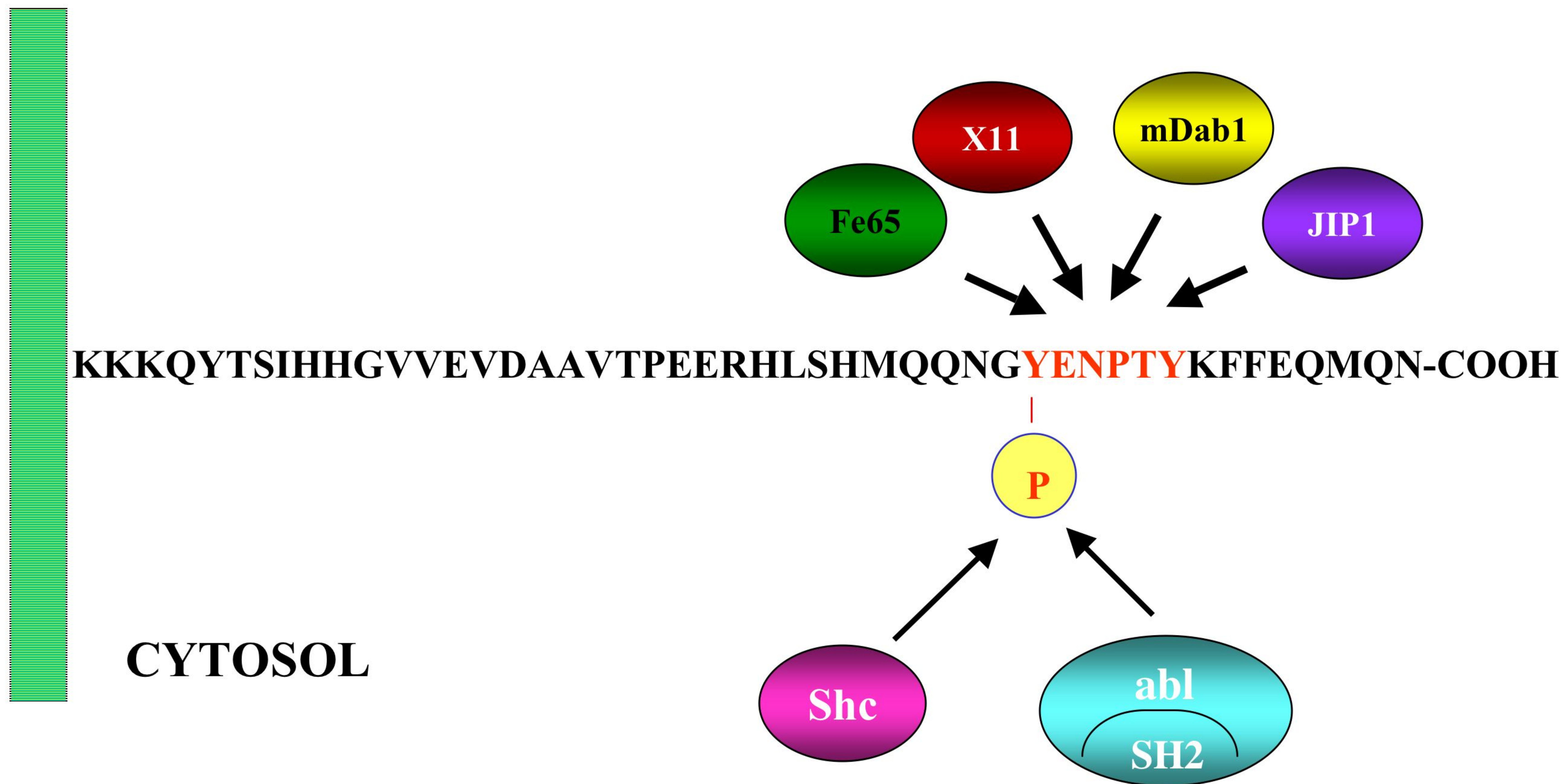


Figura 2

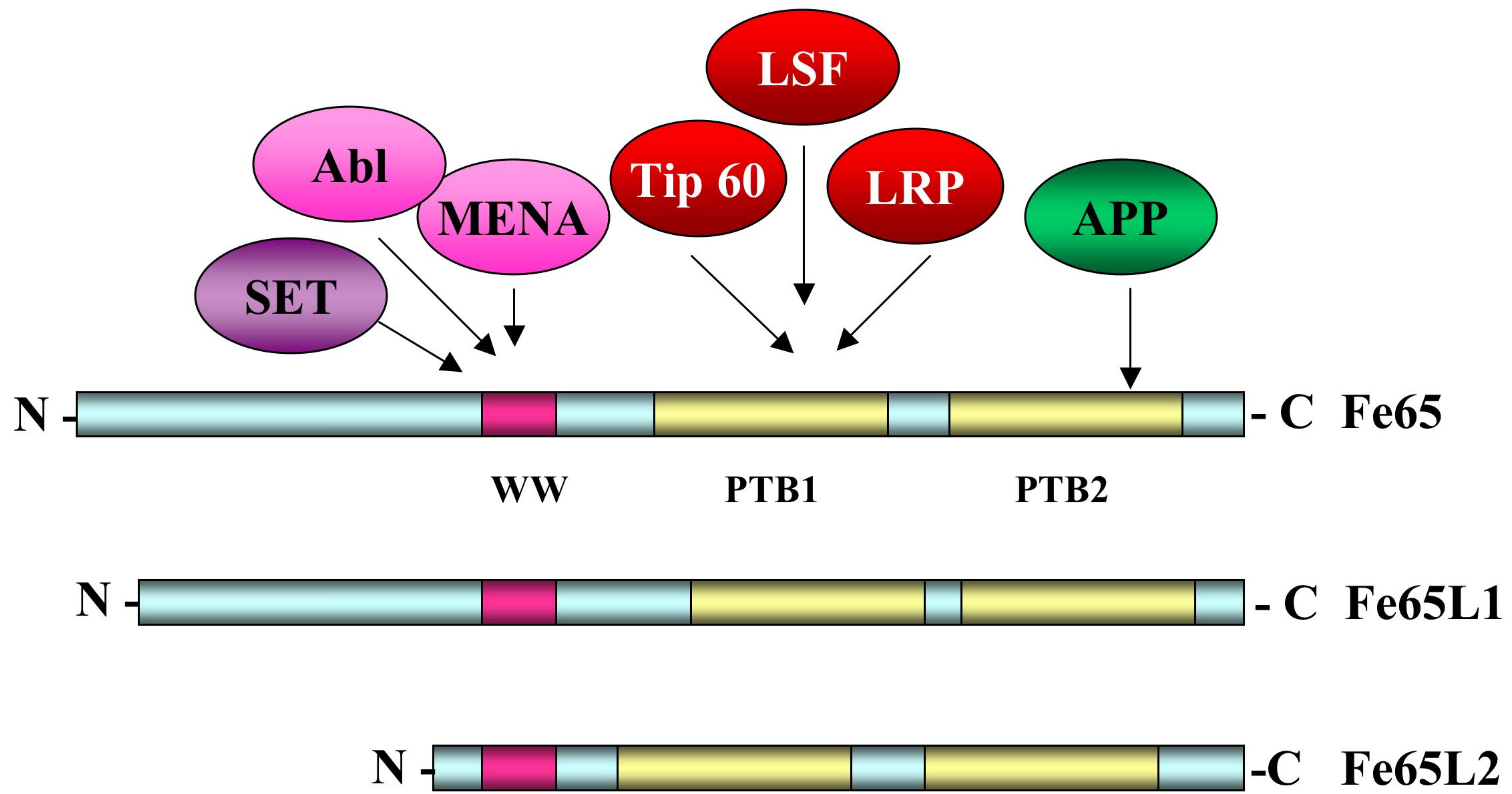


Figura 3

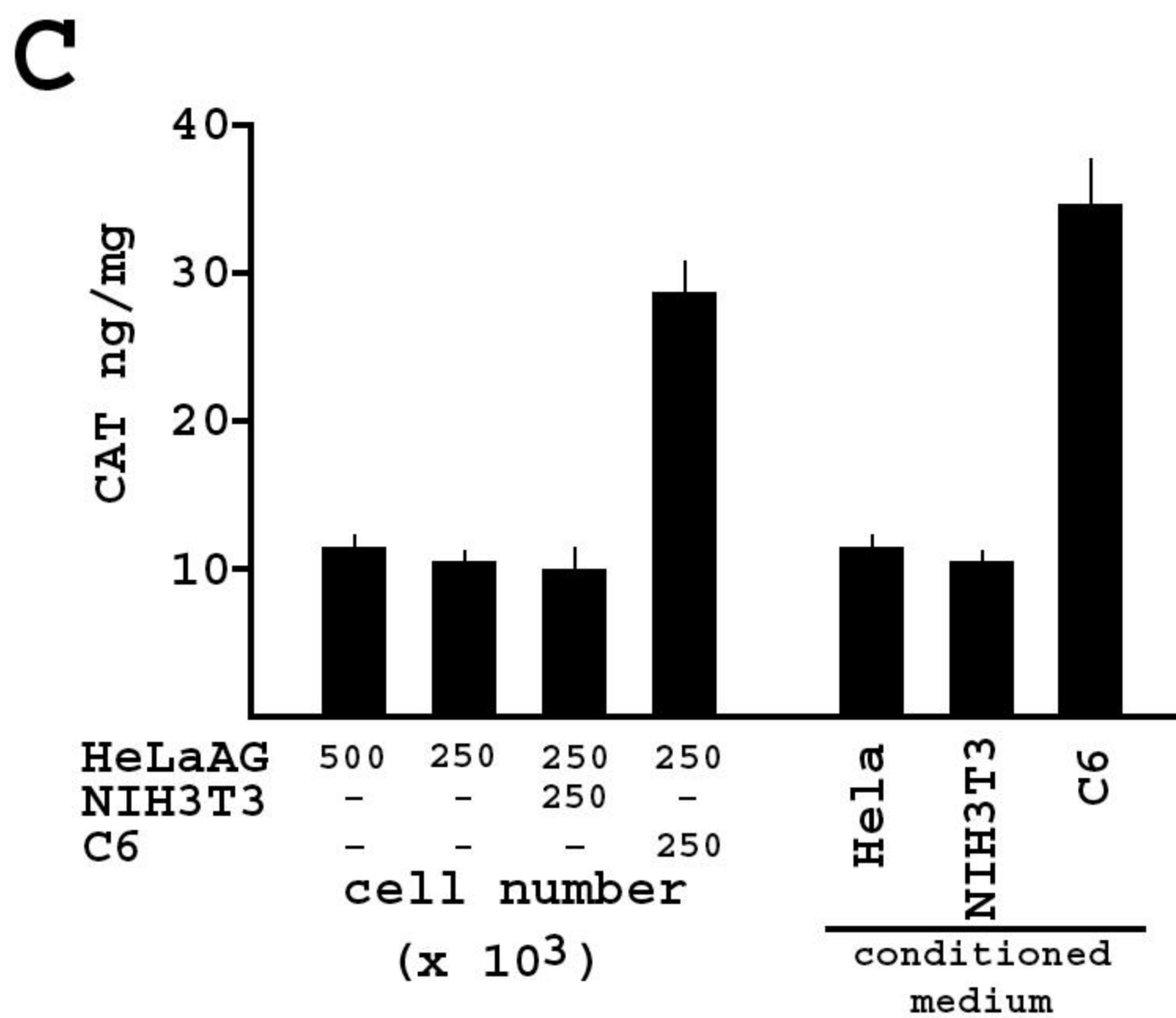
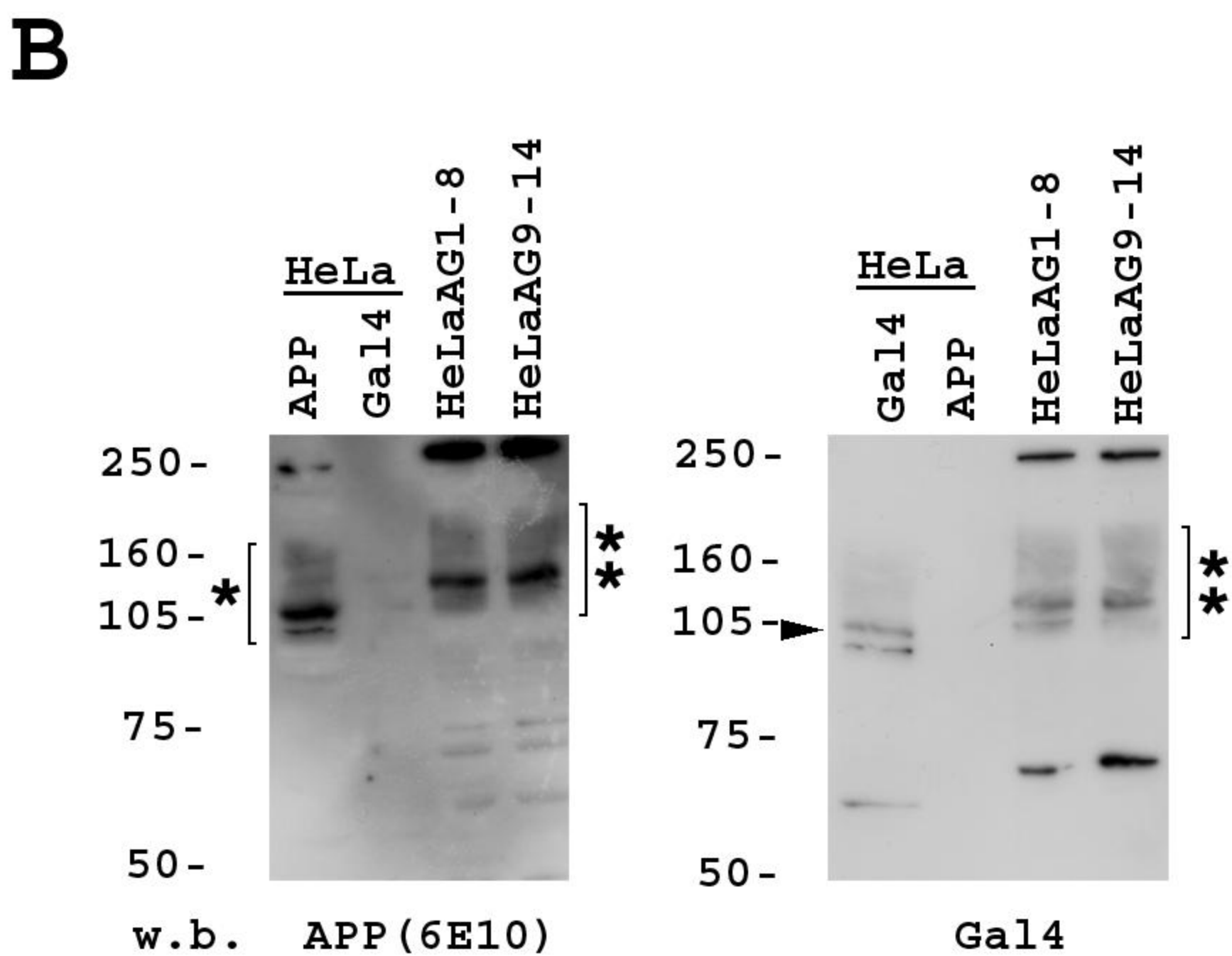
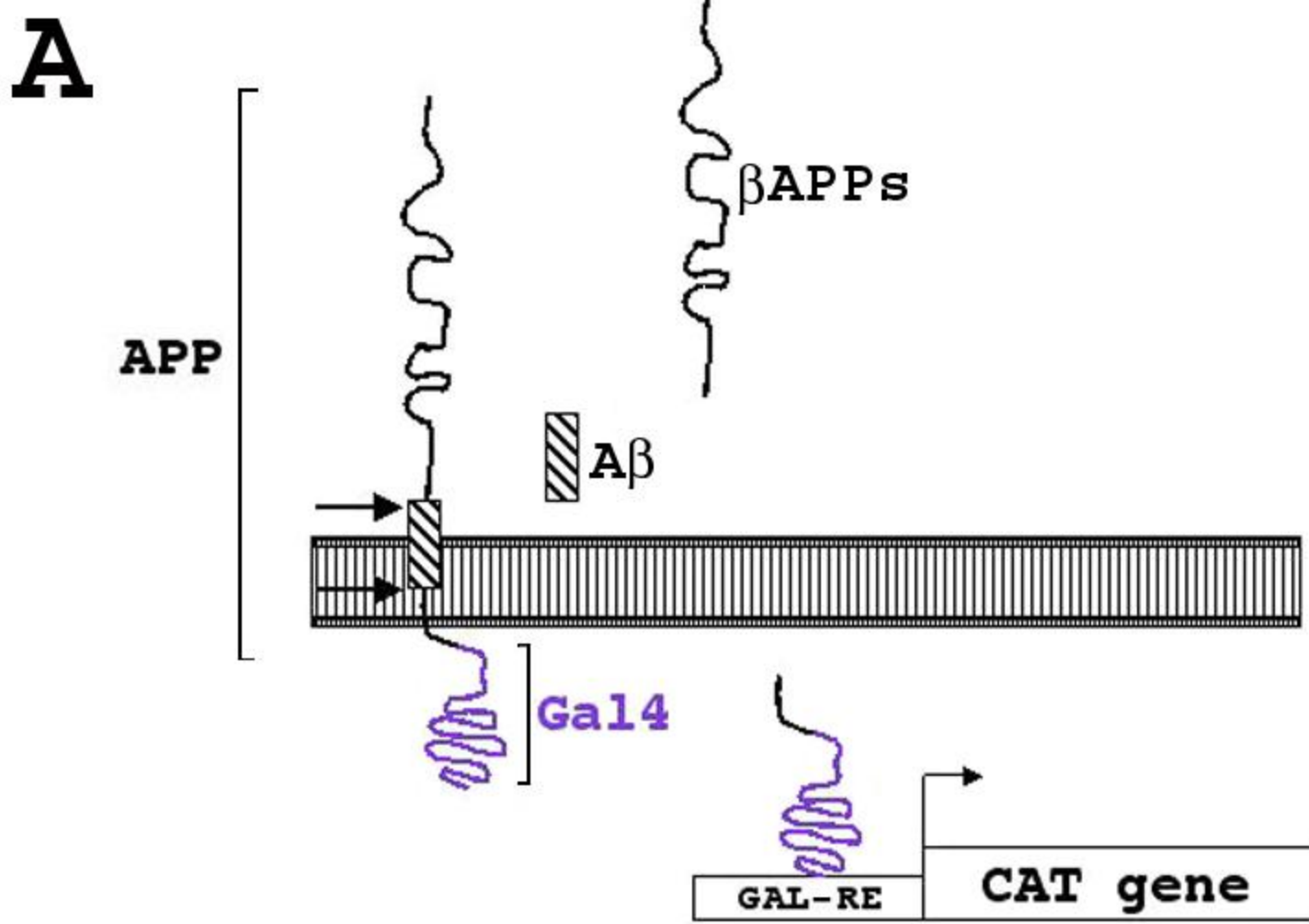


Figura 4

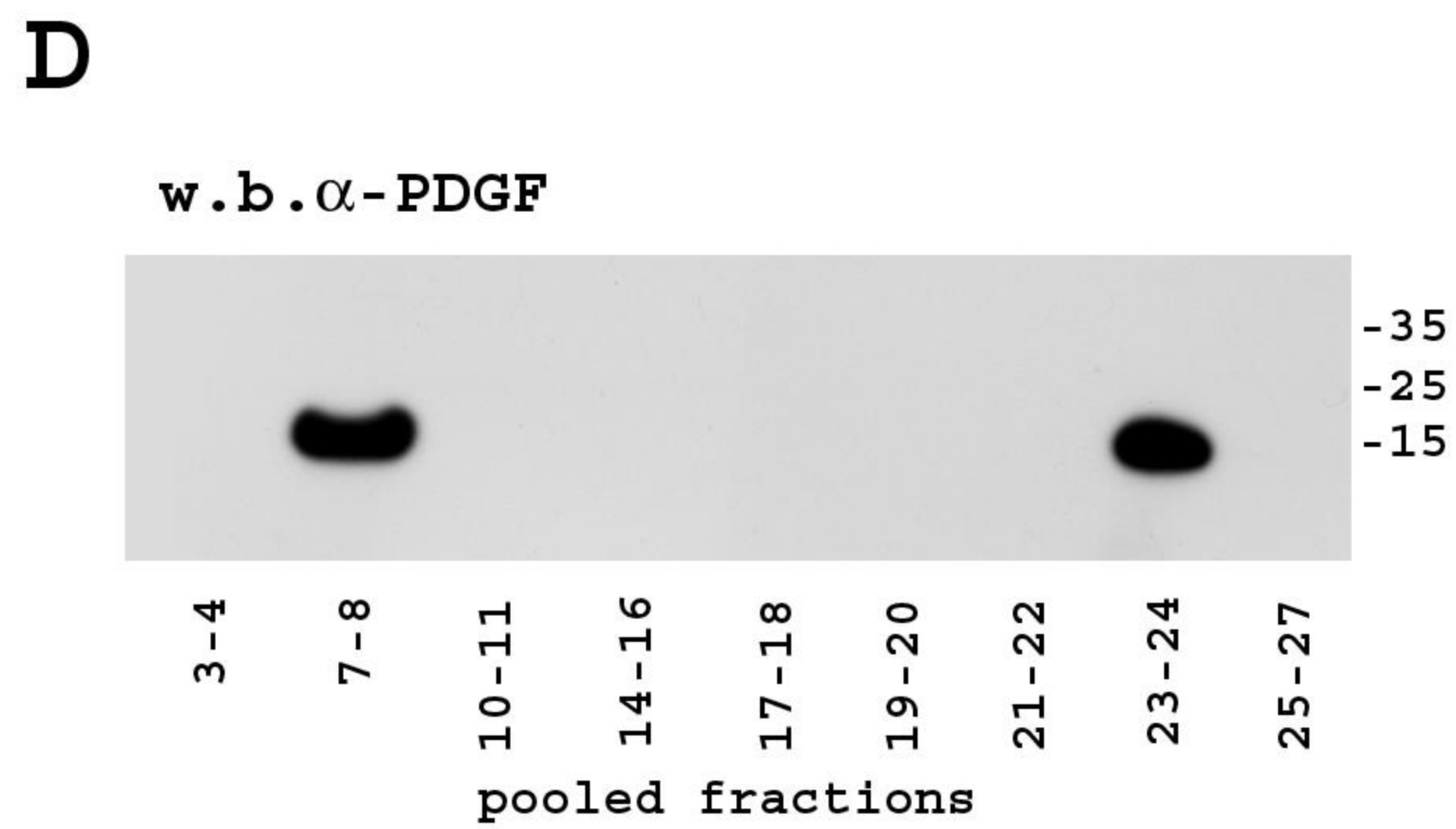
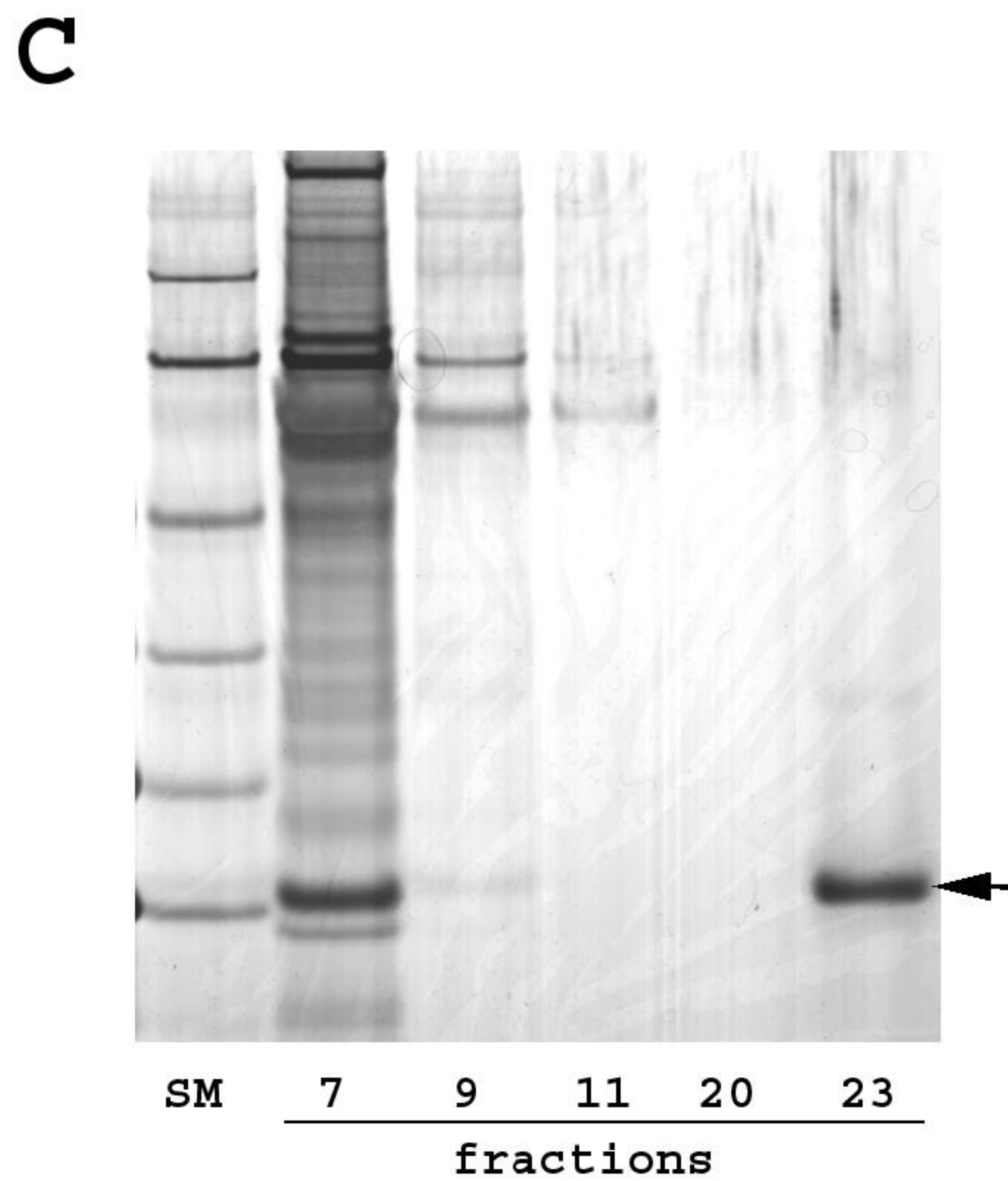
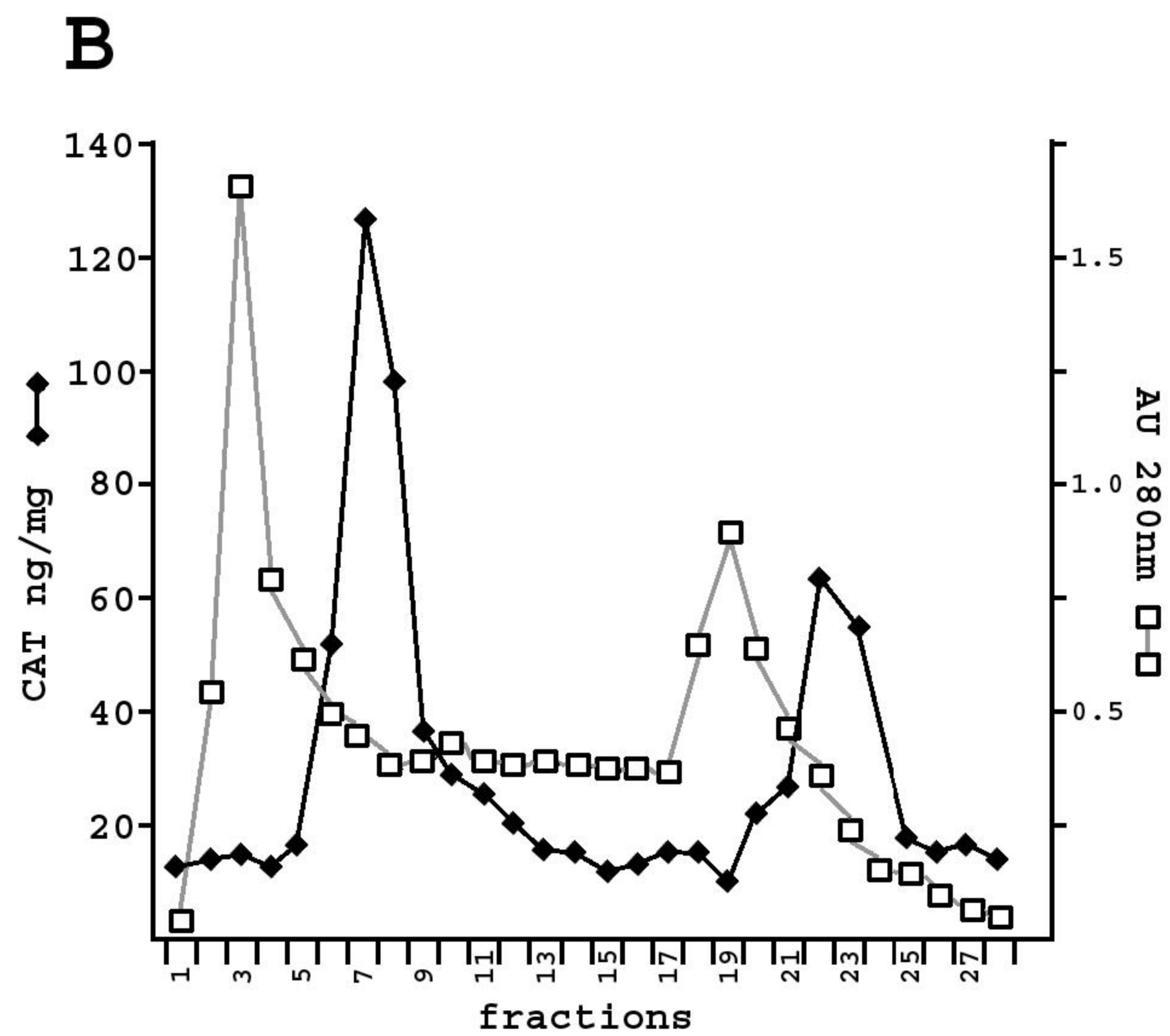
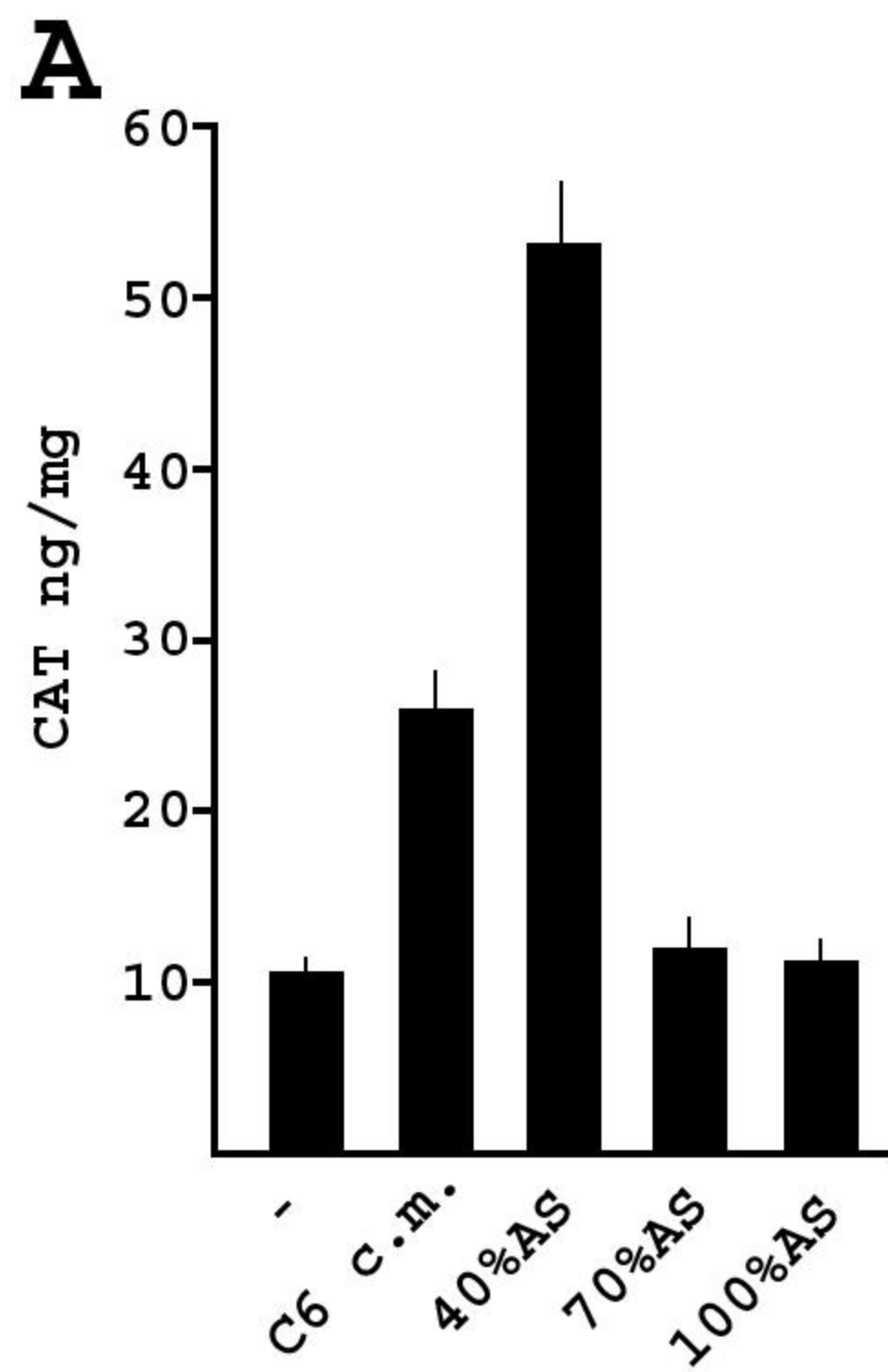


Figure 5

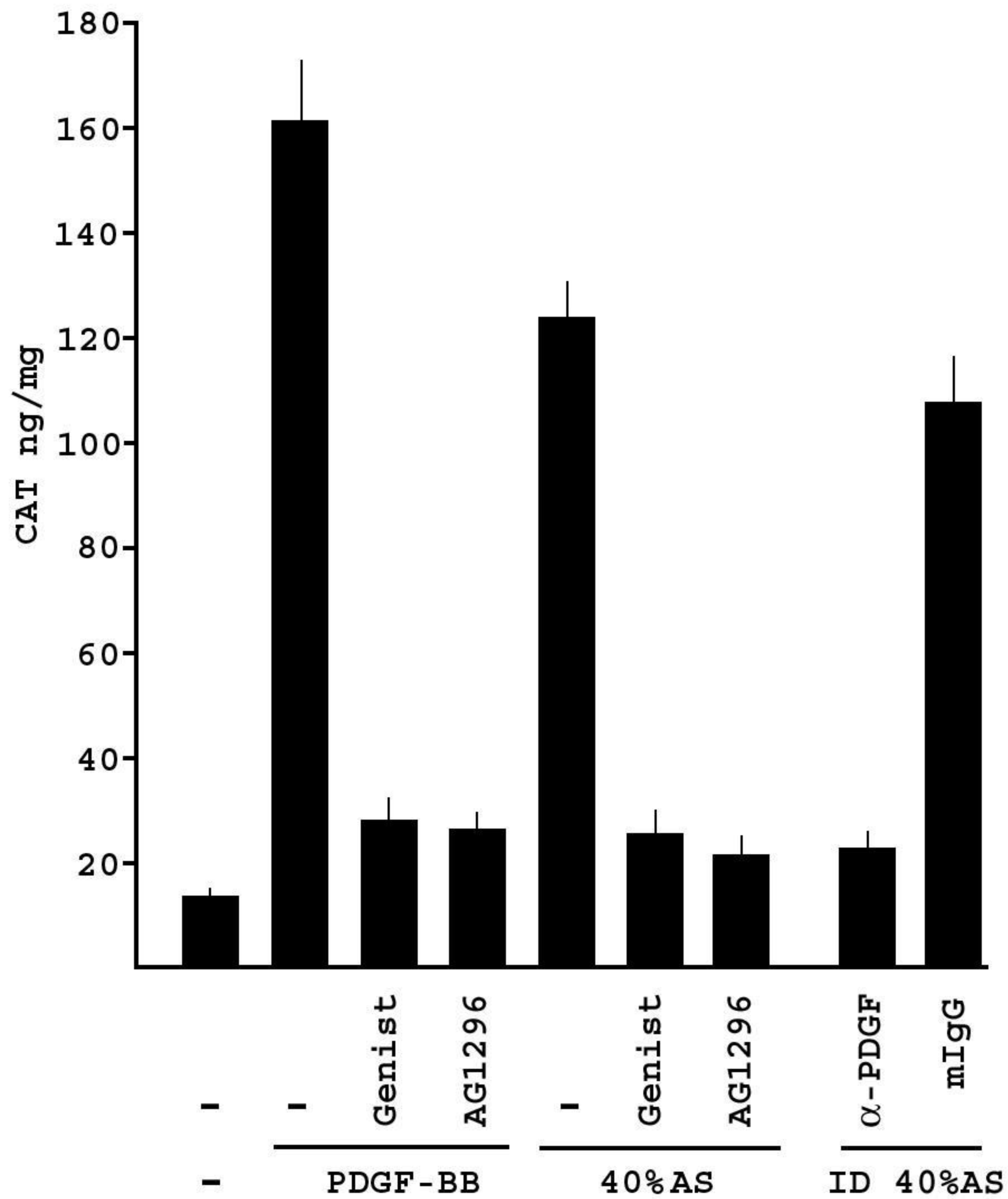


Figura 6

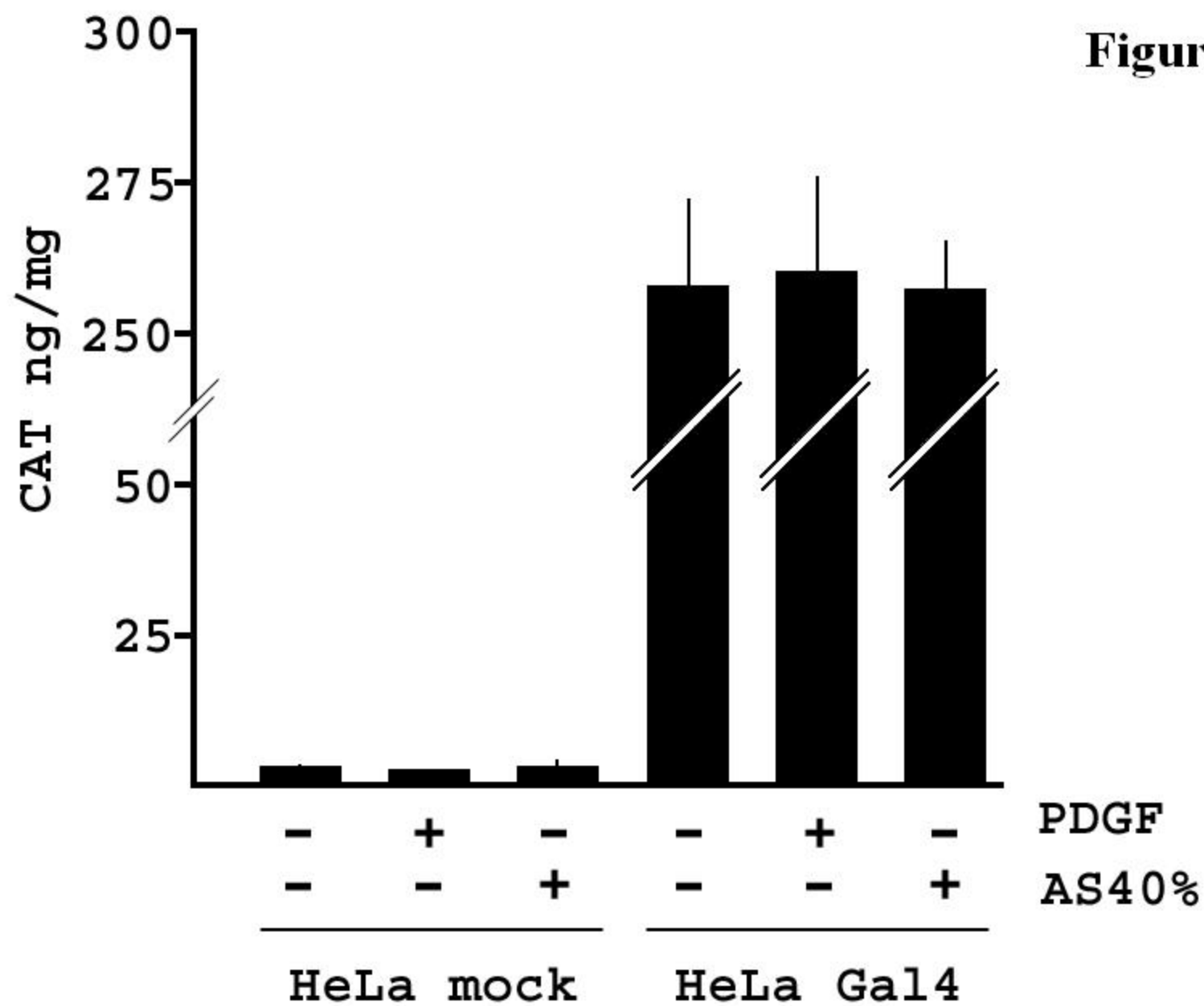
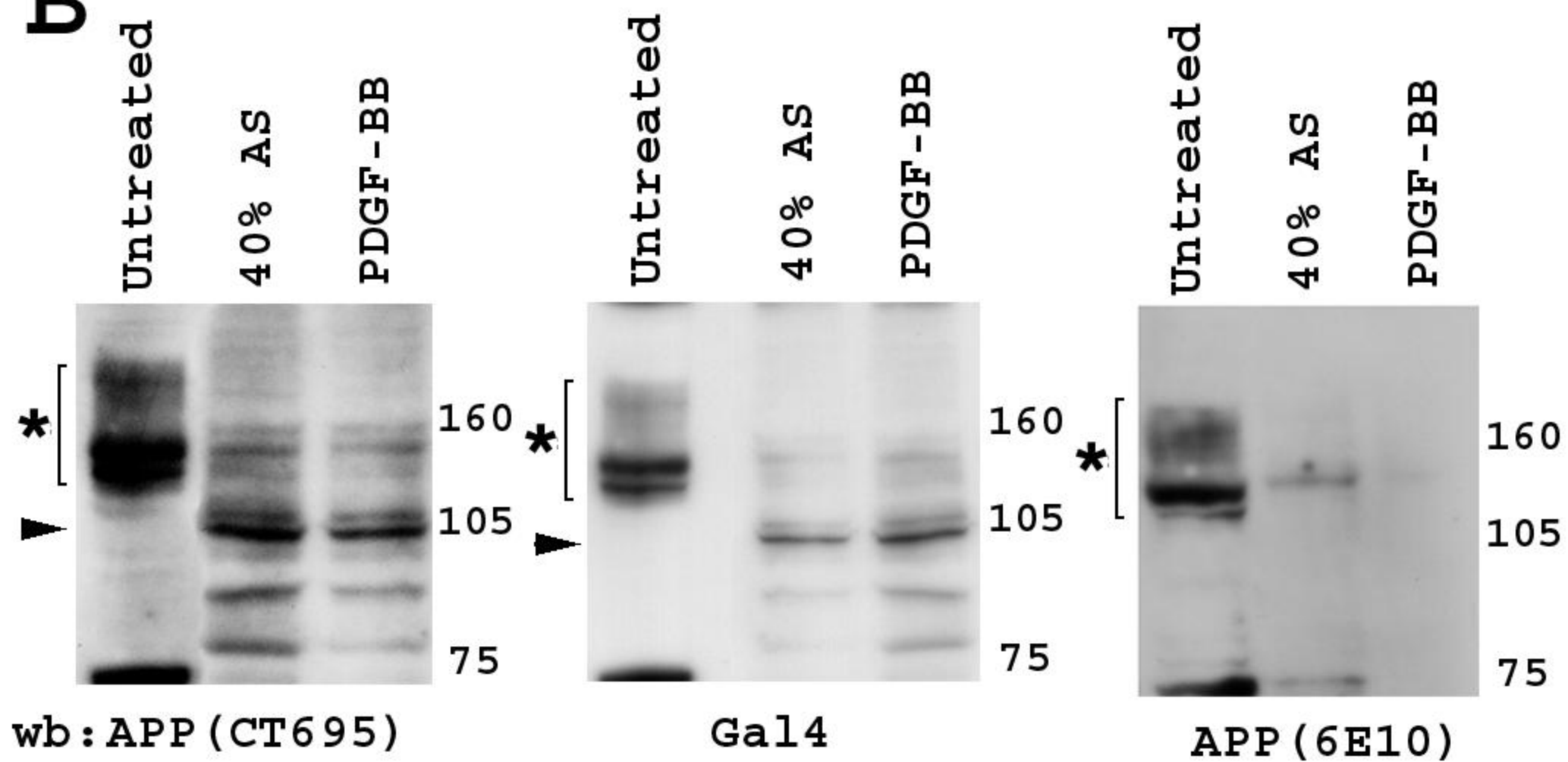
A**B**

Figura 8

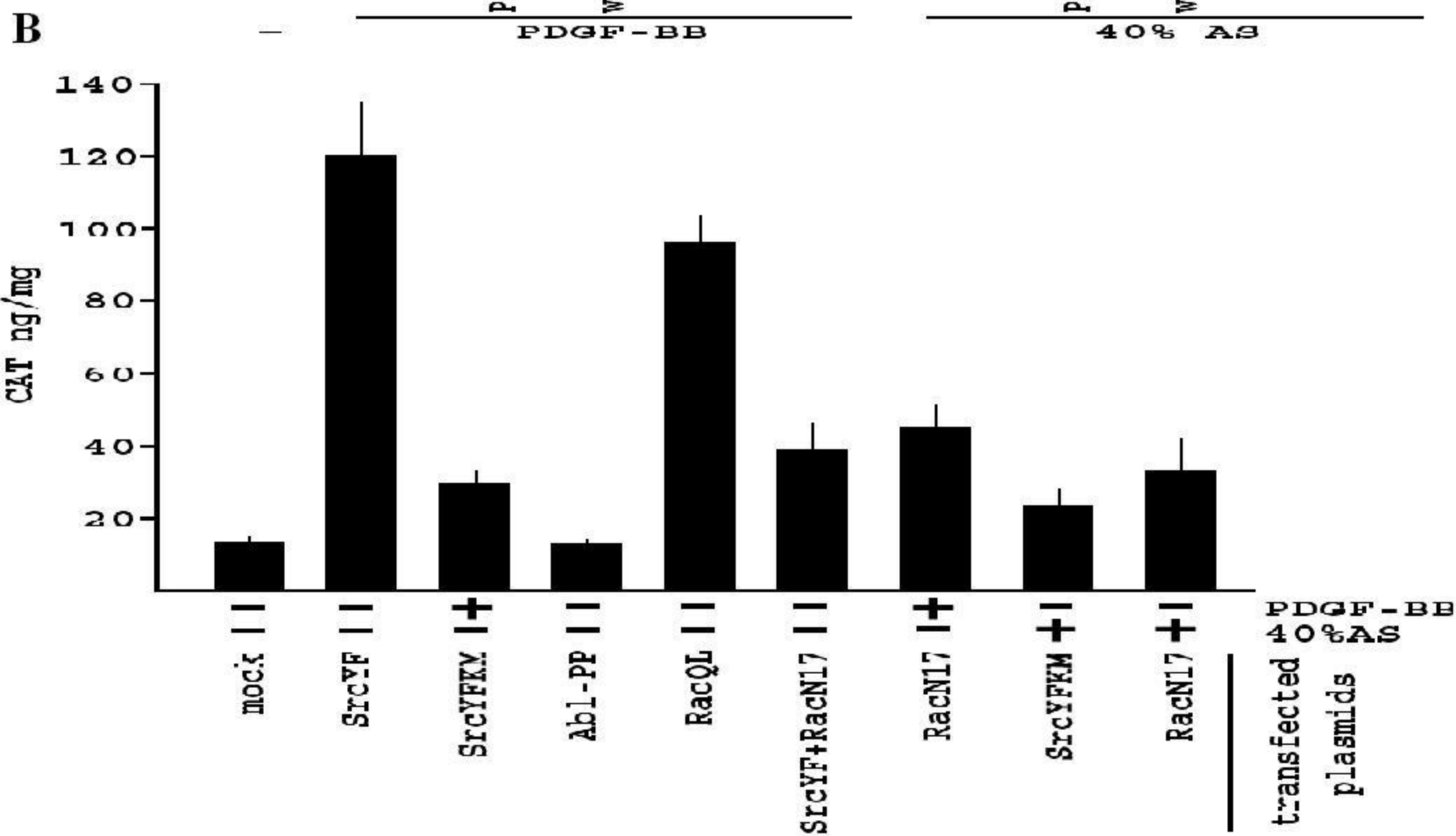
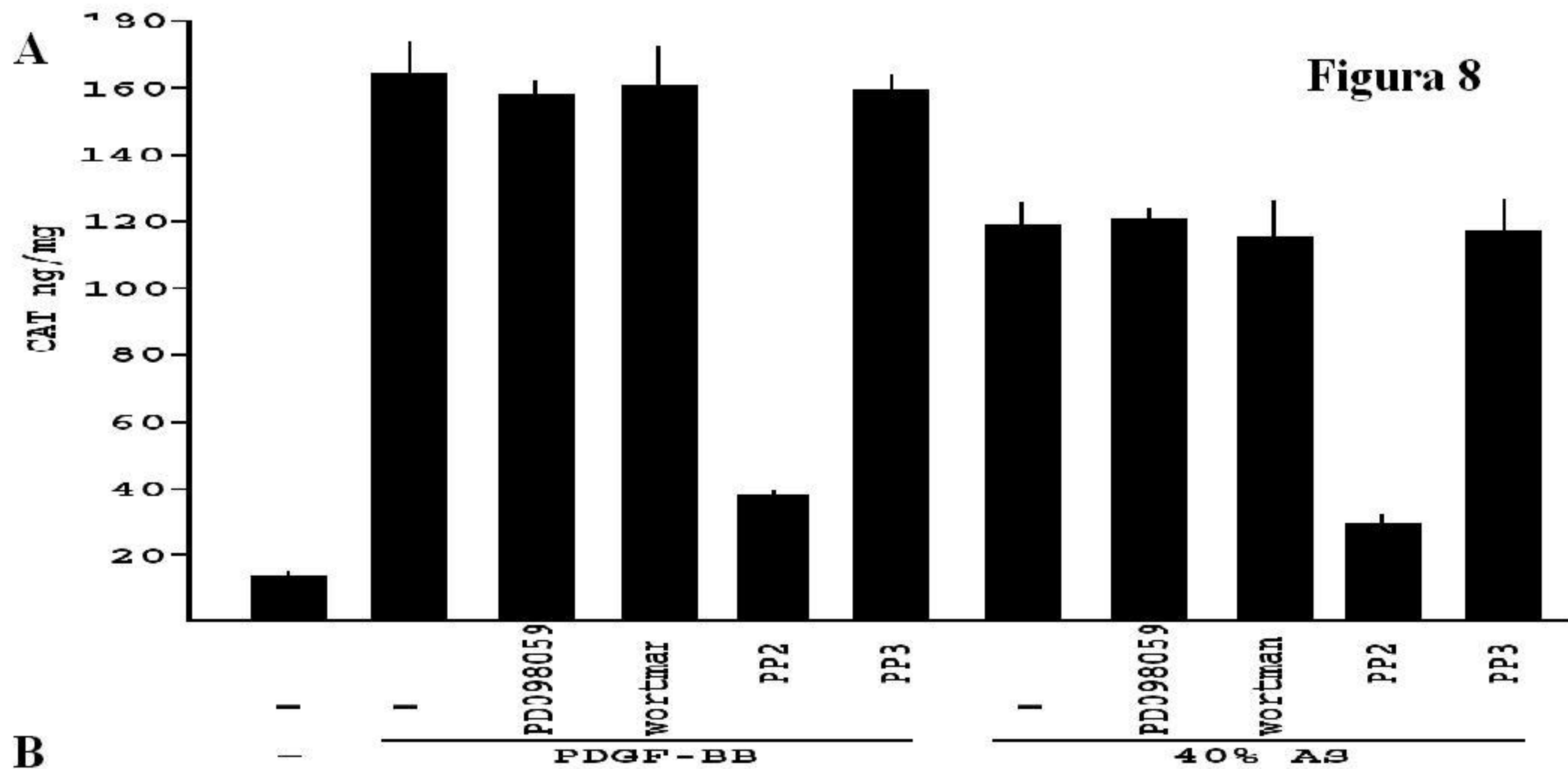
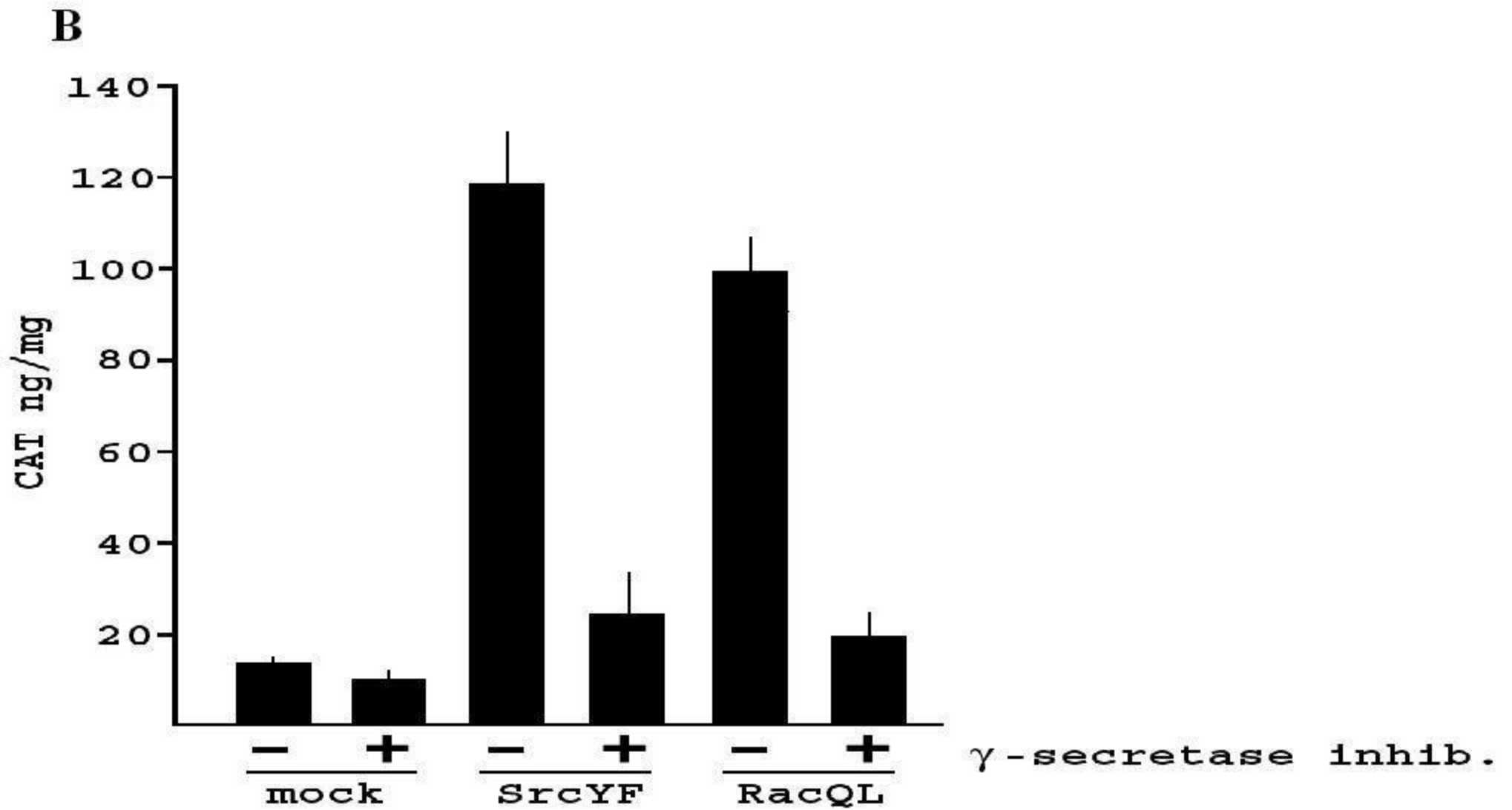
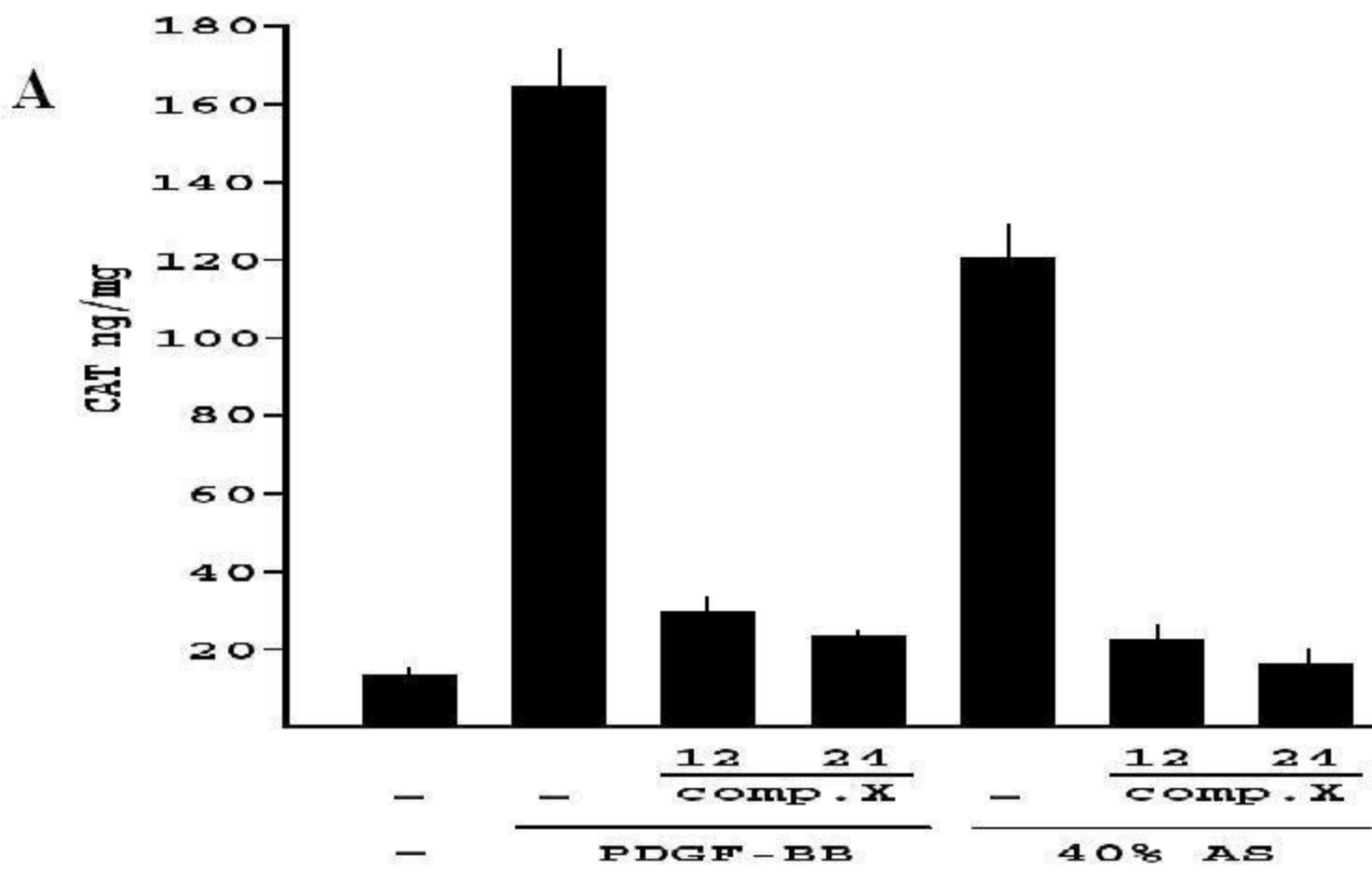


Figura 9



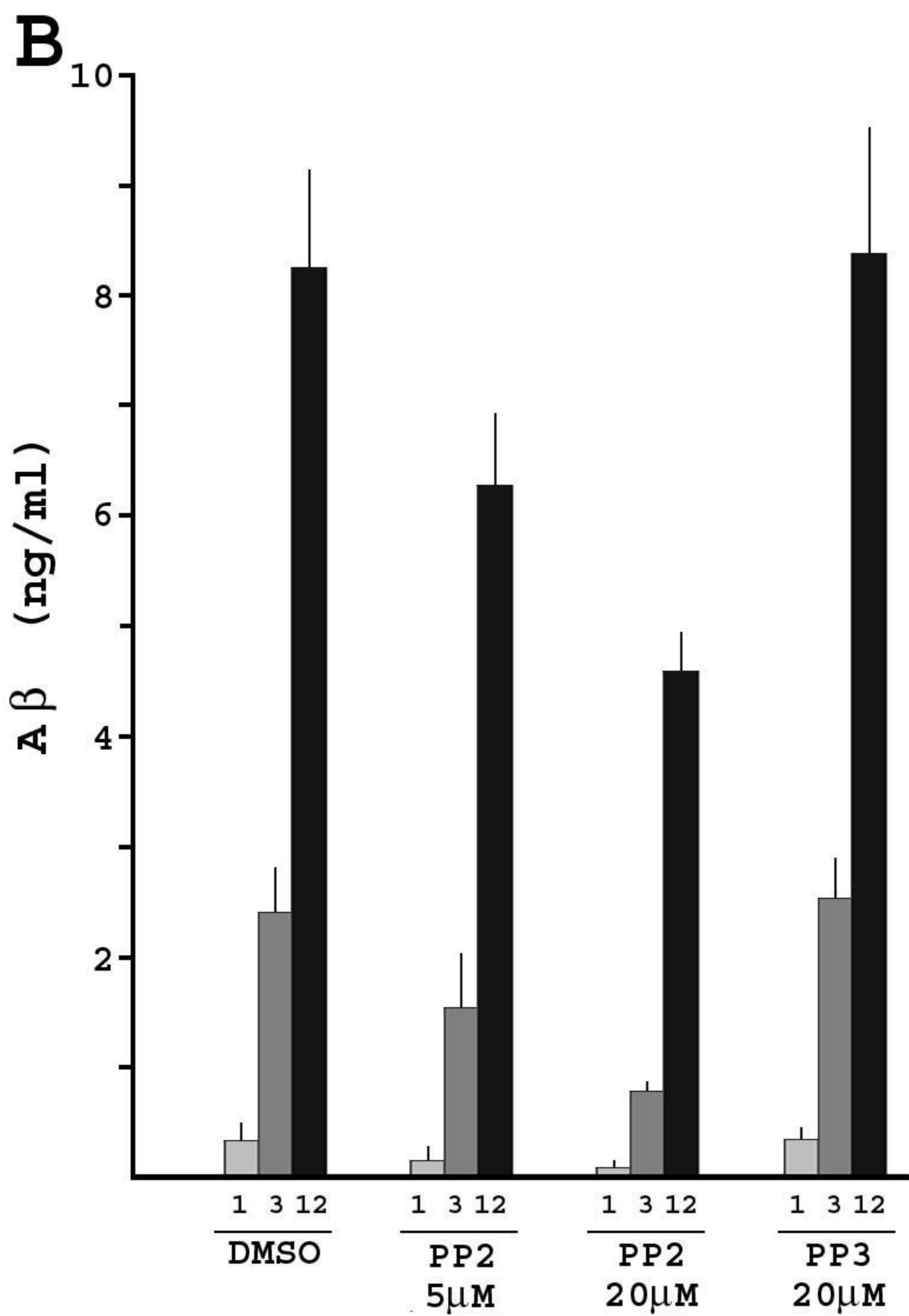
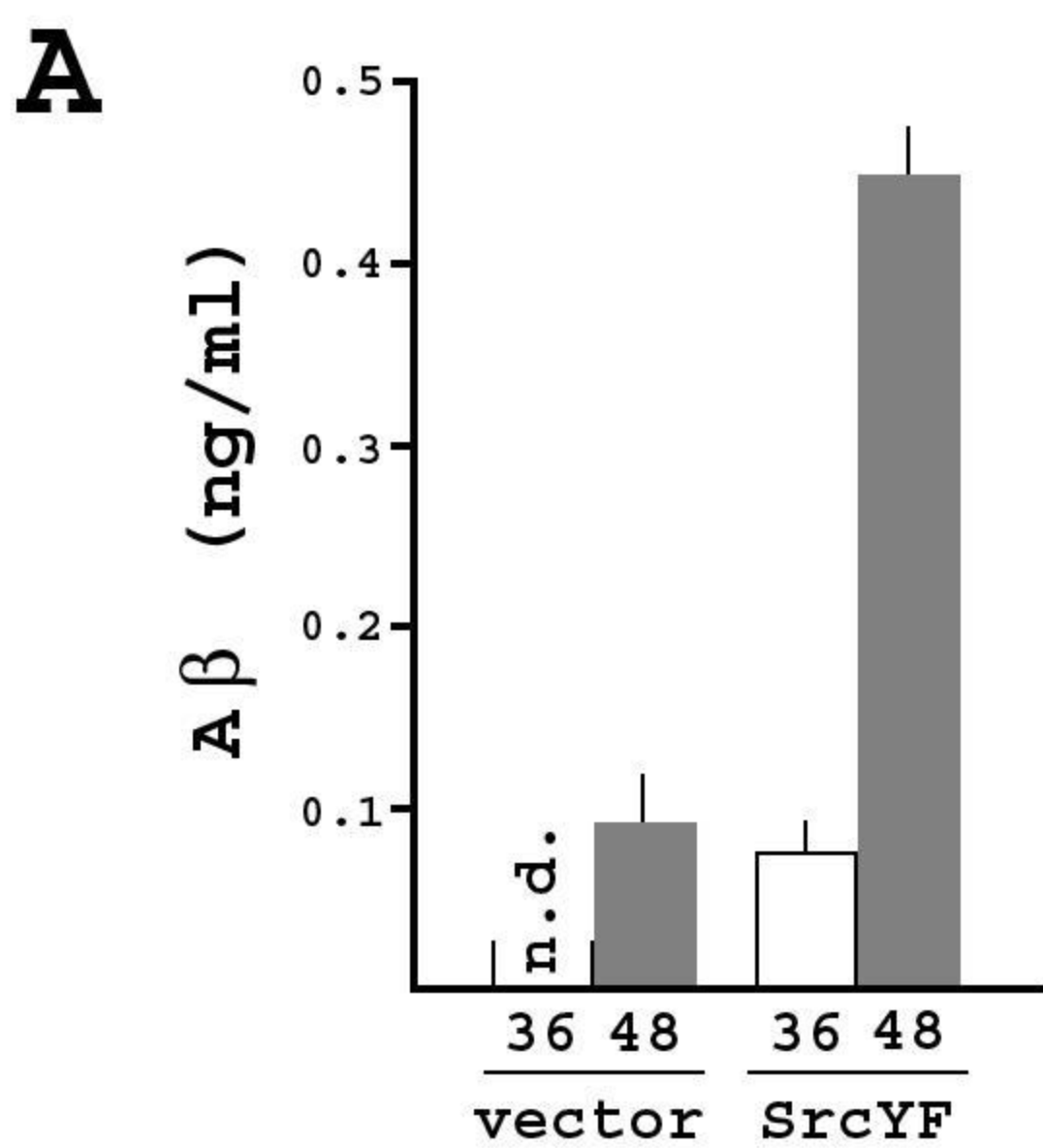
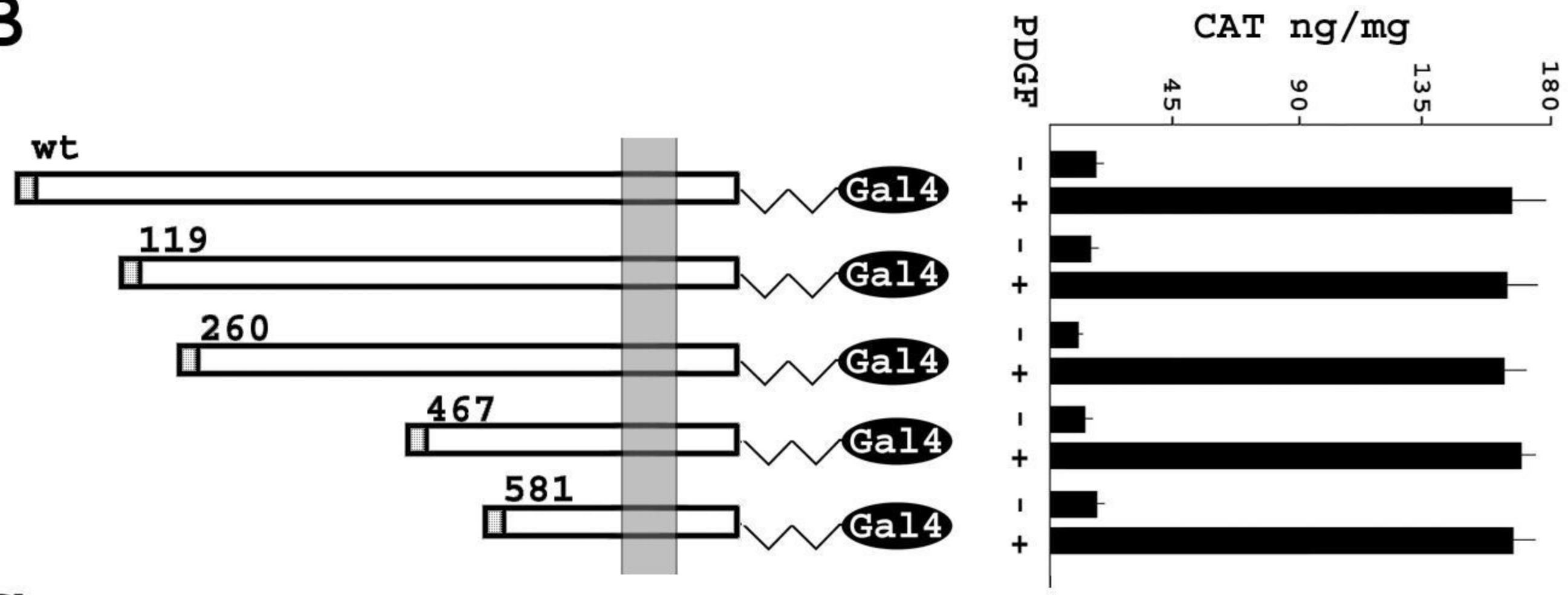
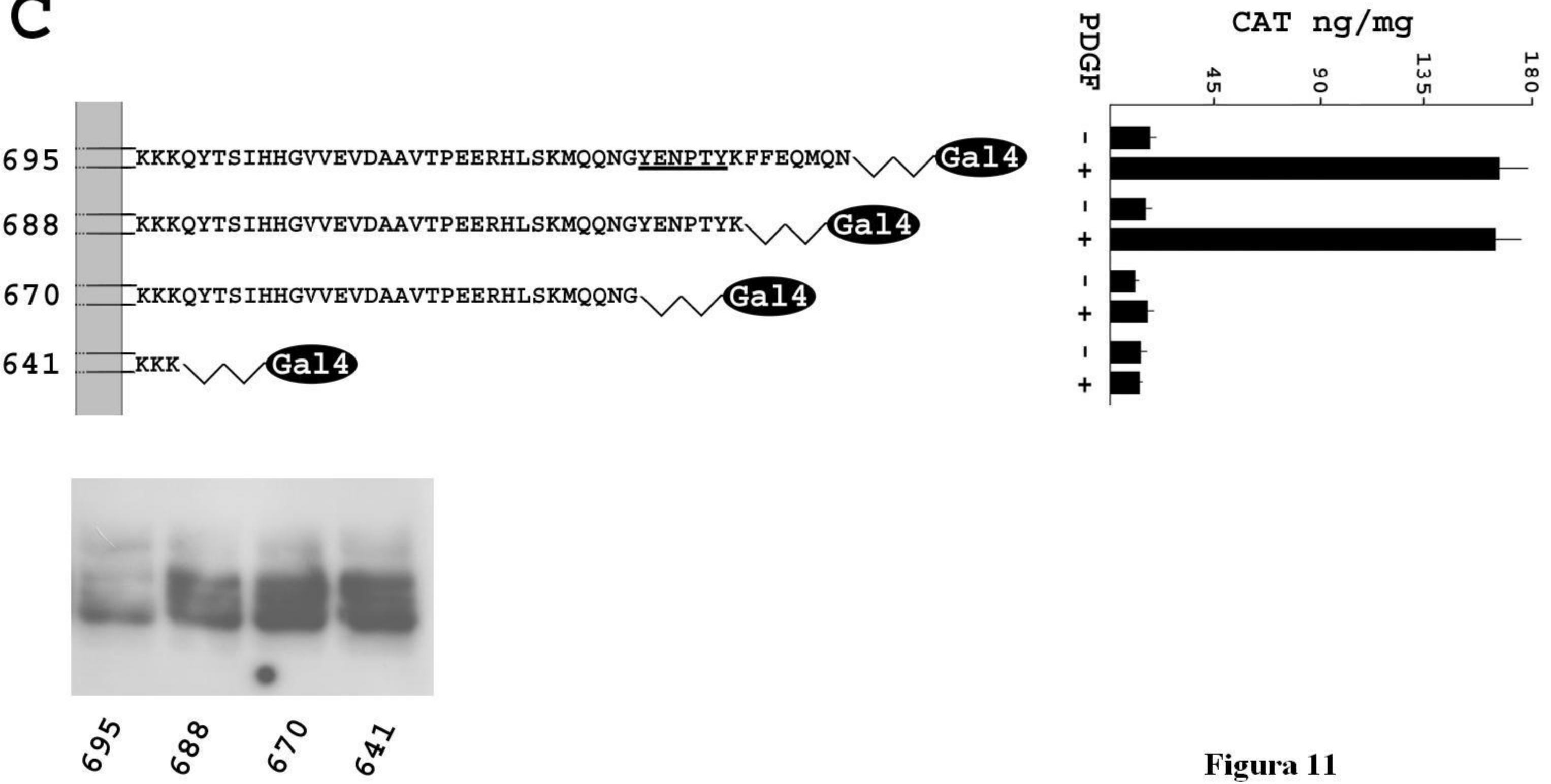


Figura 10

B**C****Figura 11**

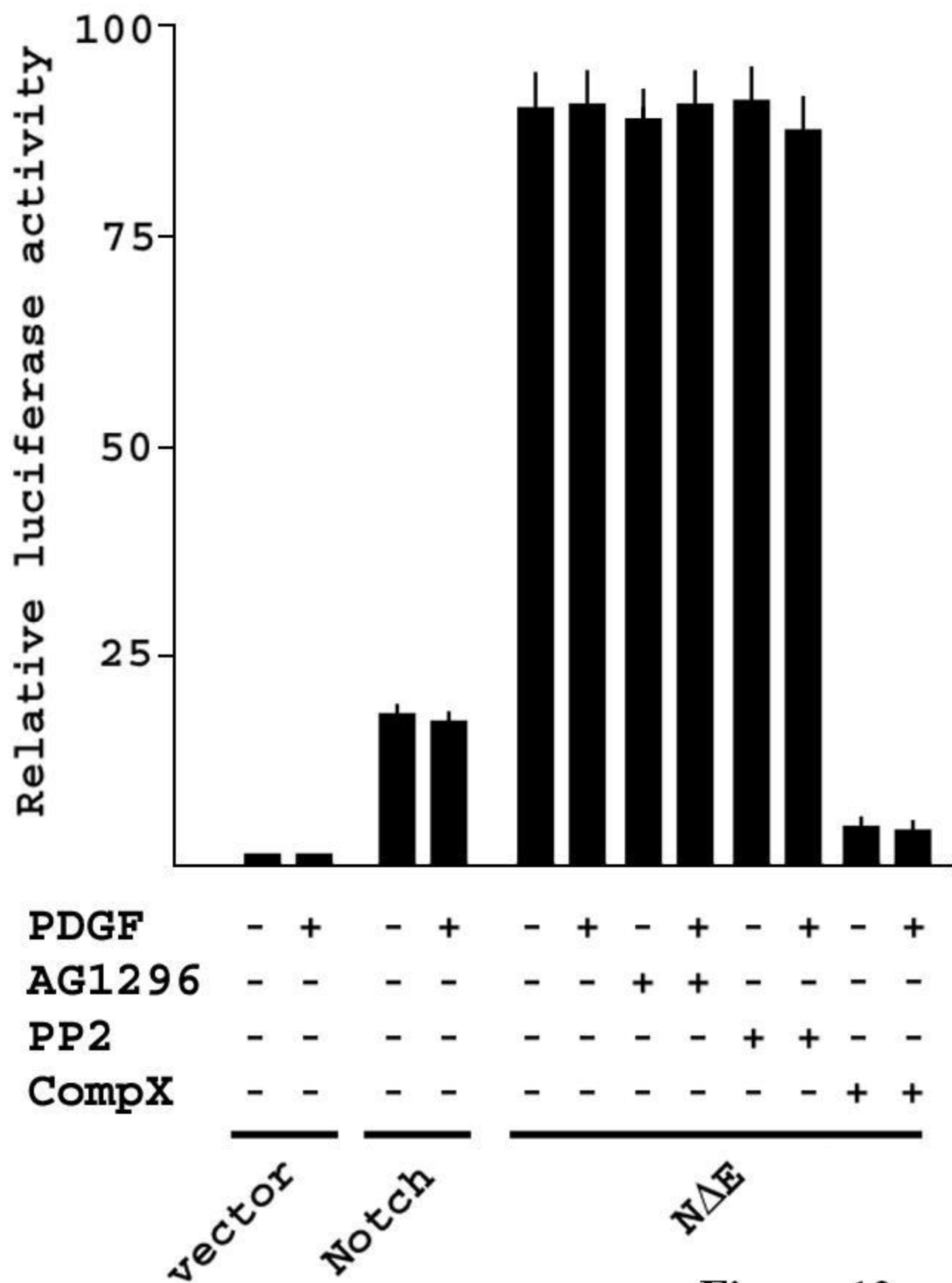


Figura 12

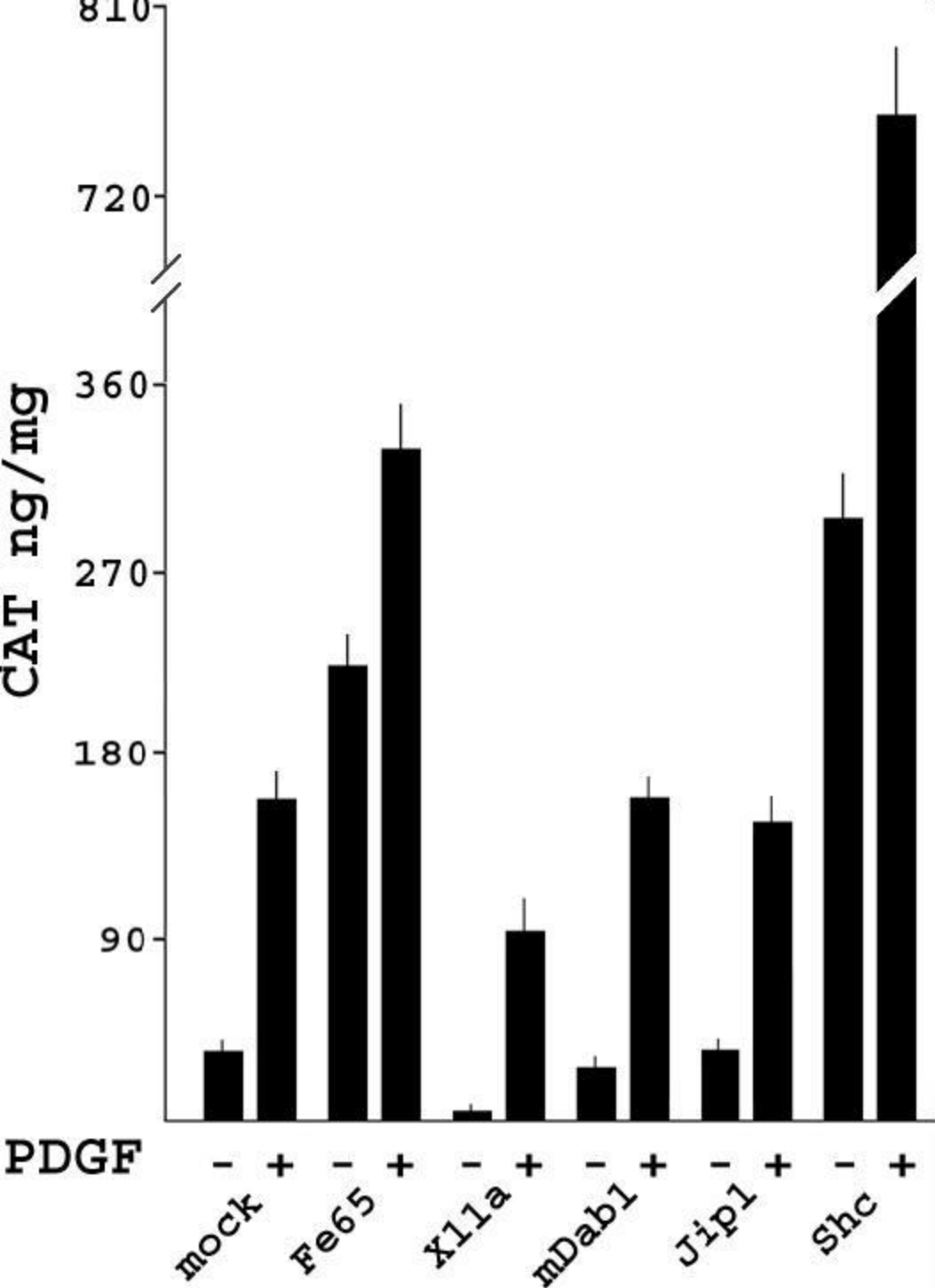


Figura 13

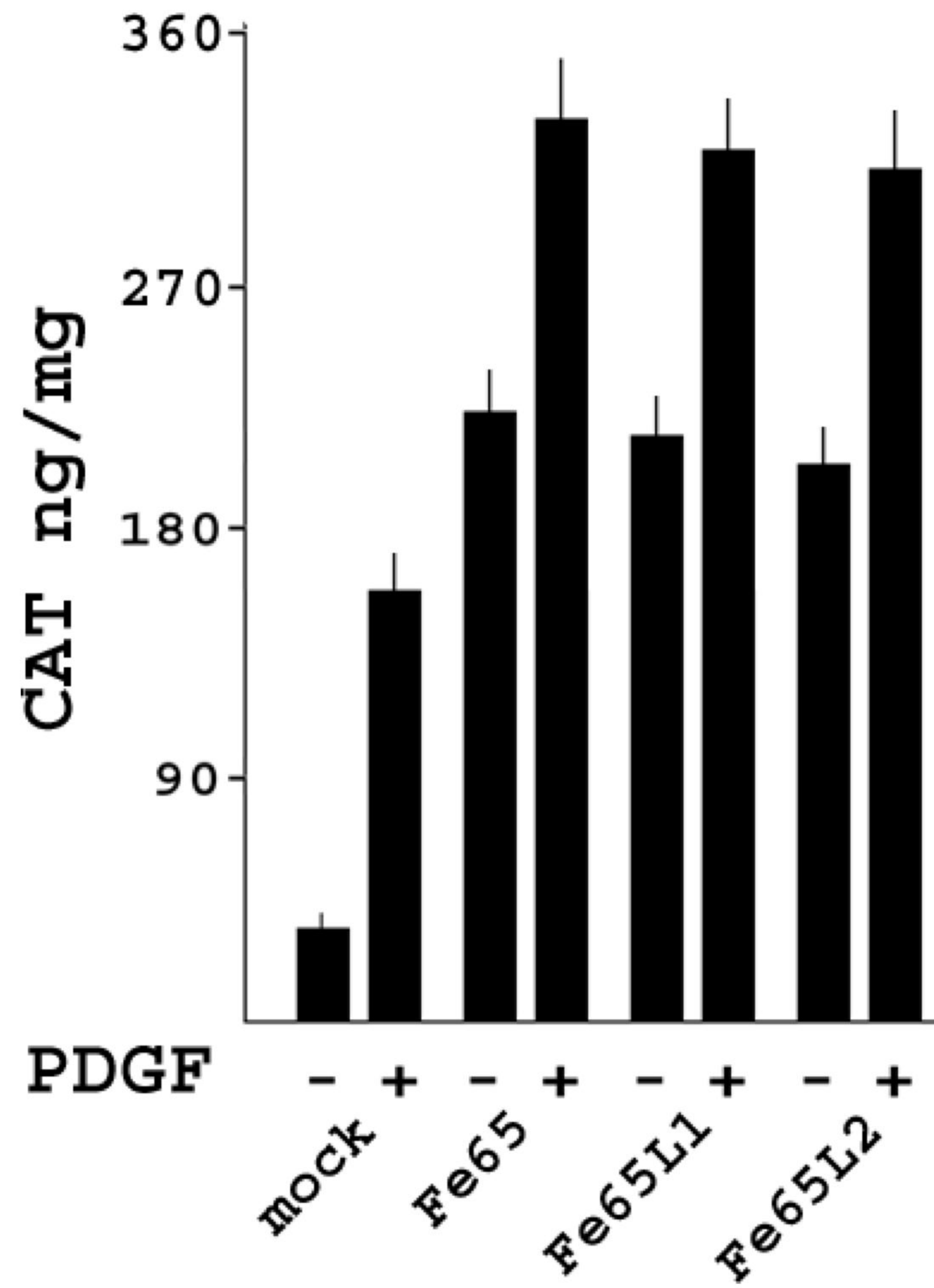
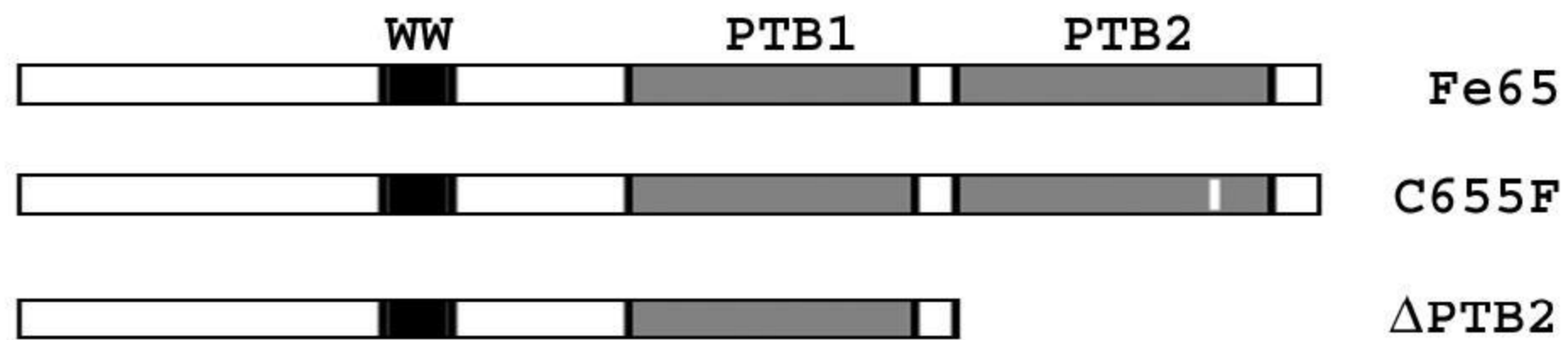
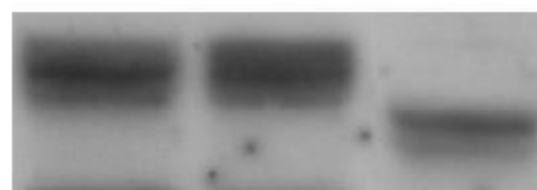
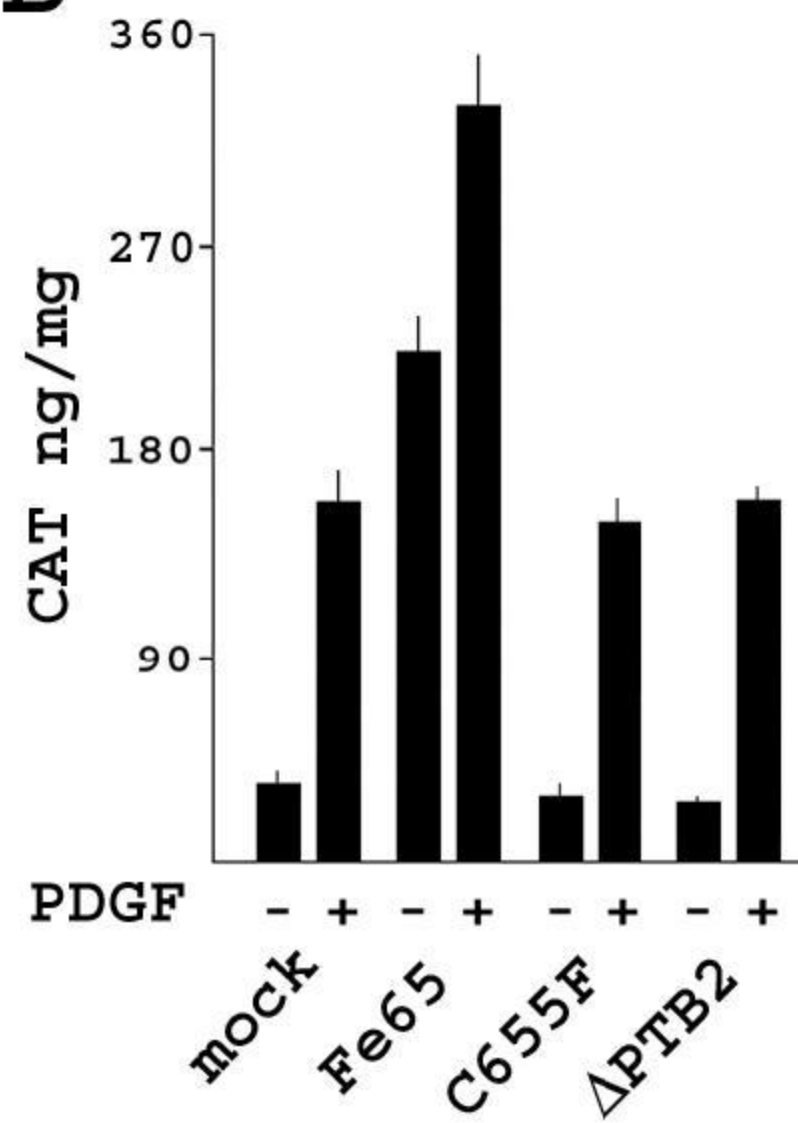
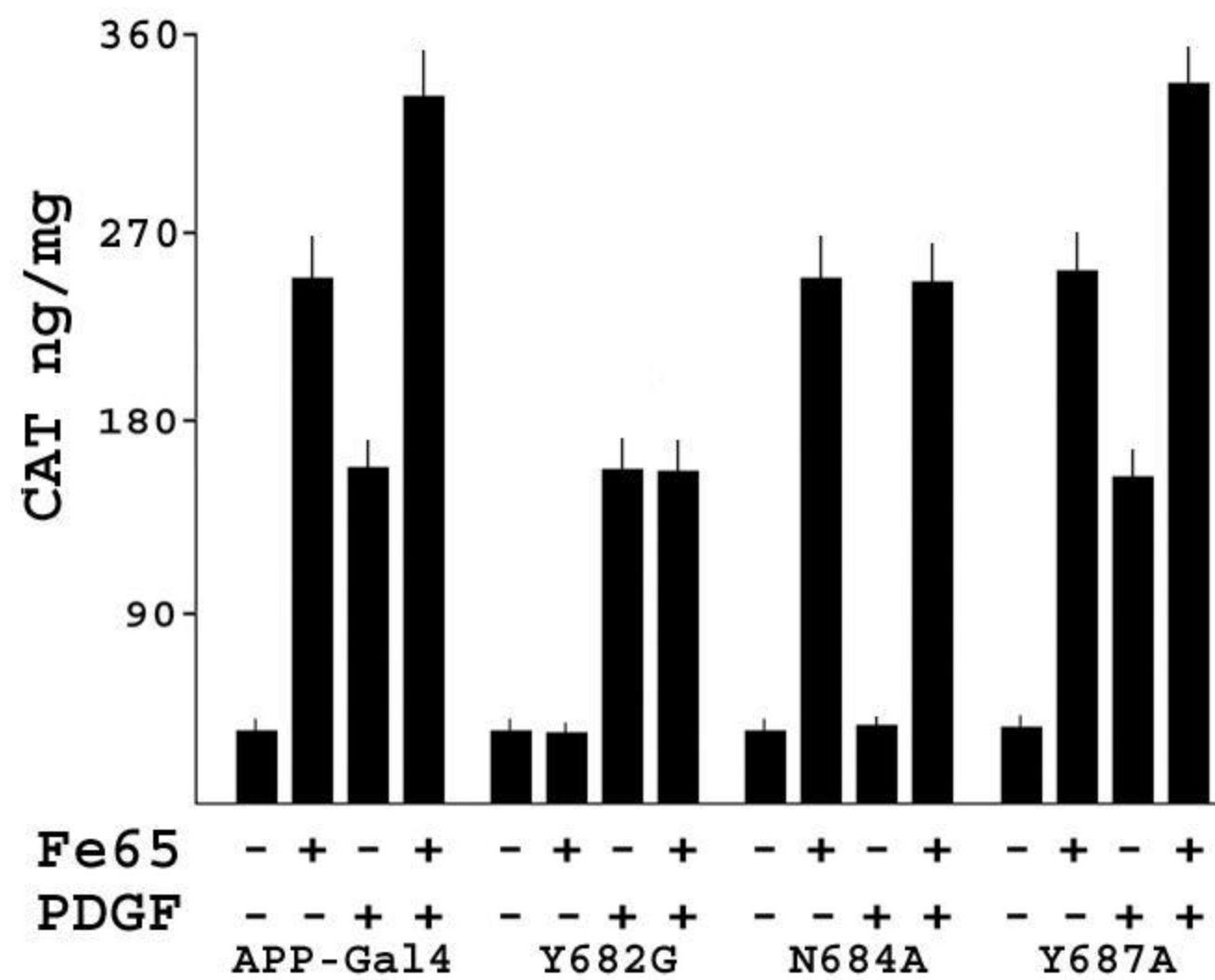


Figura 14

A**B****Figura 15**



d e f g

Figura 16

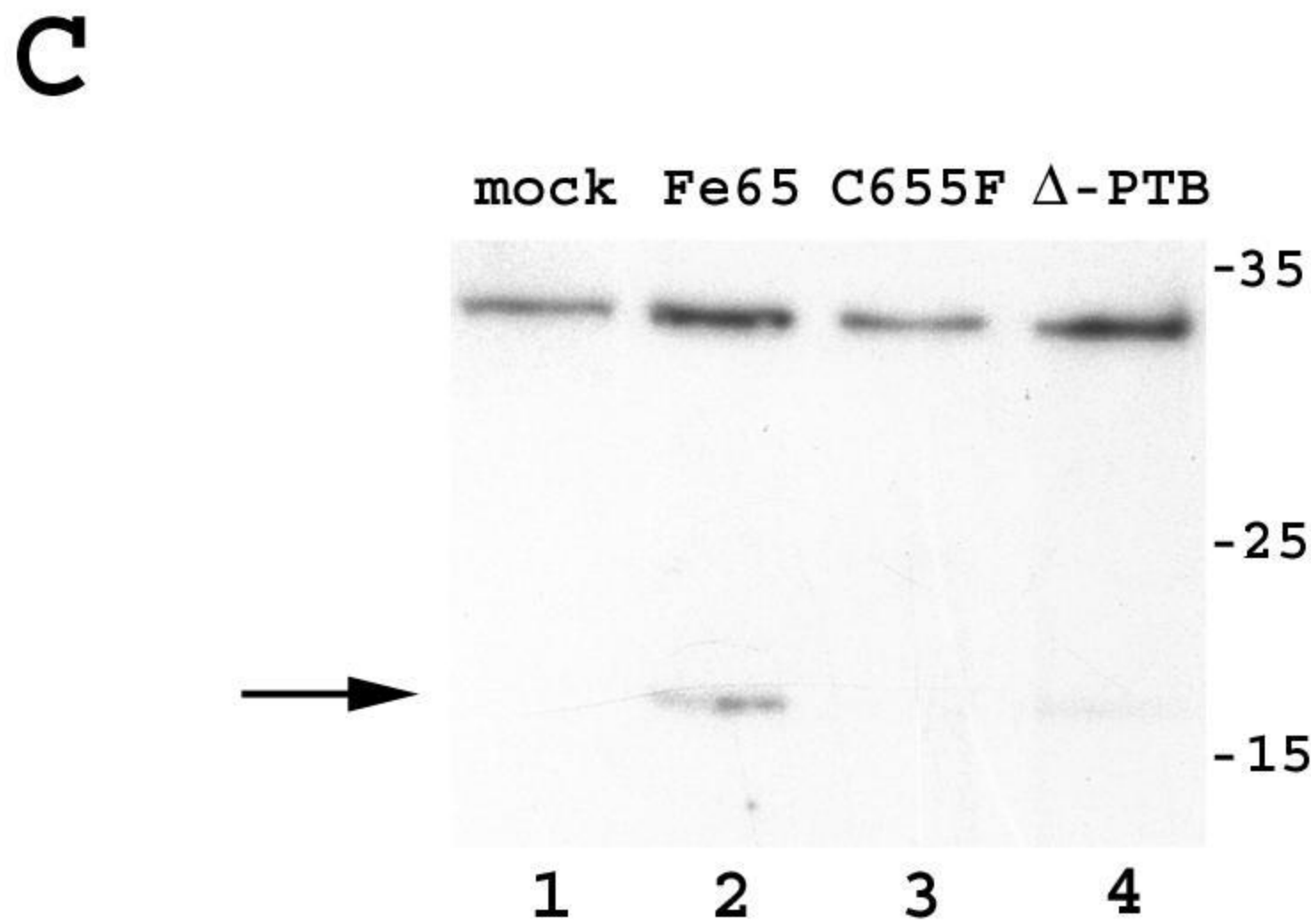
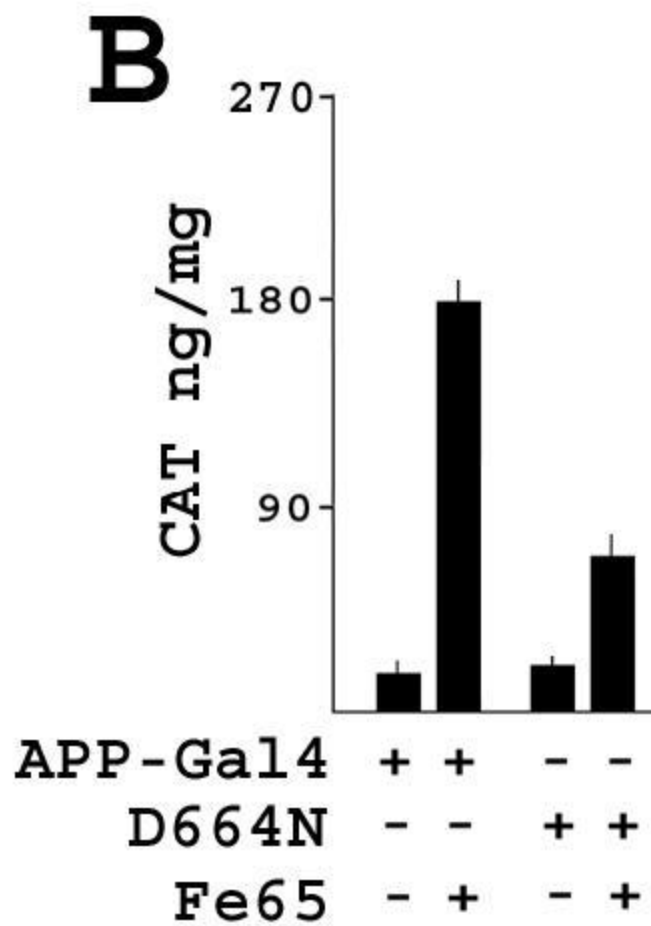
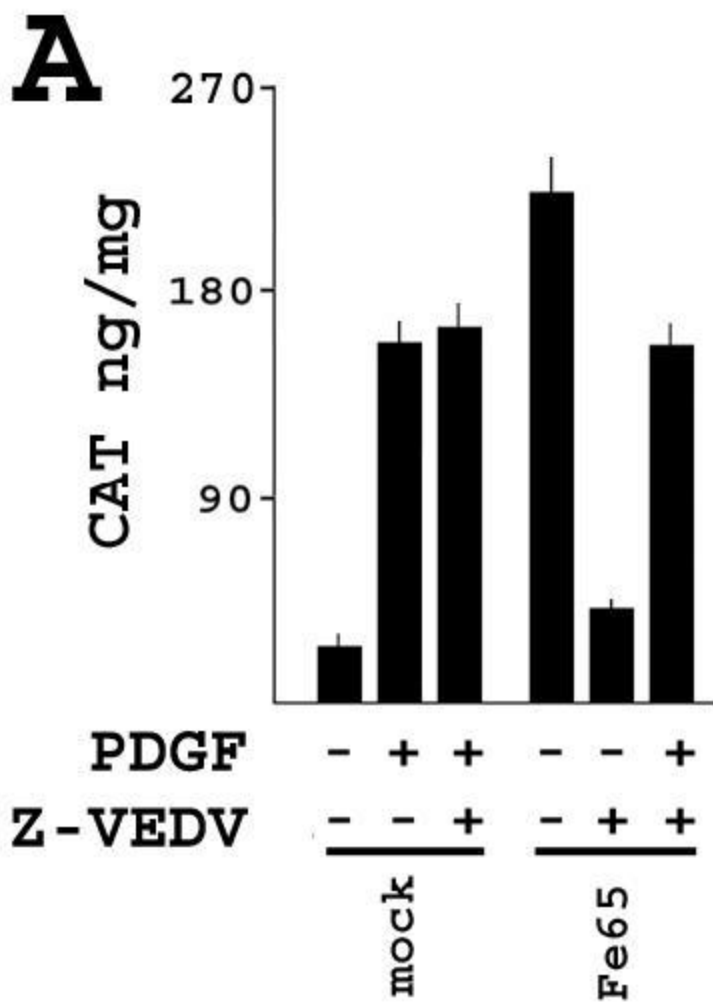


Figura 17

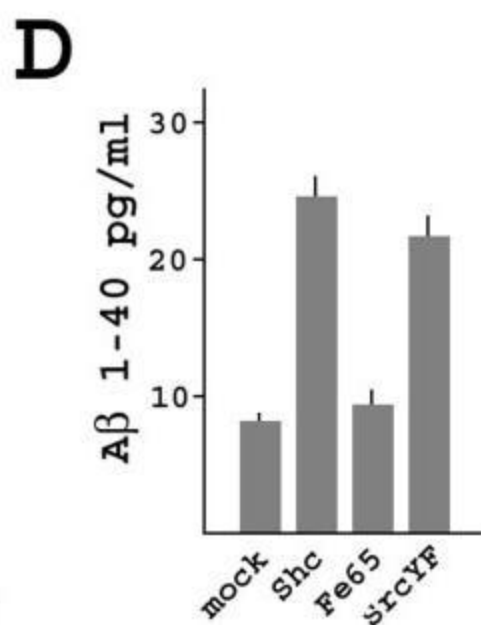
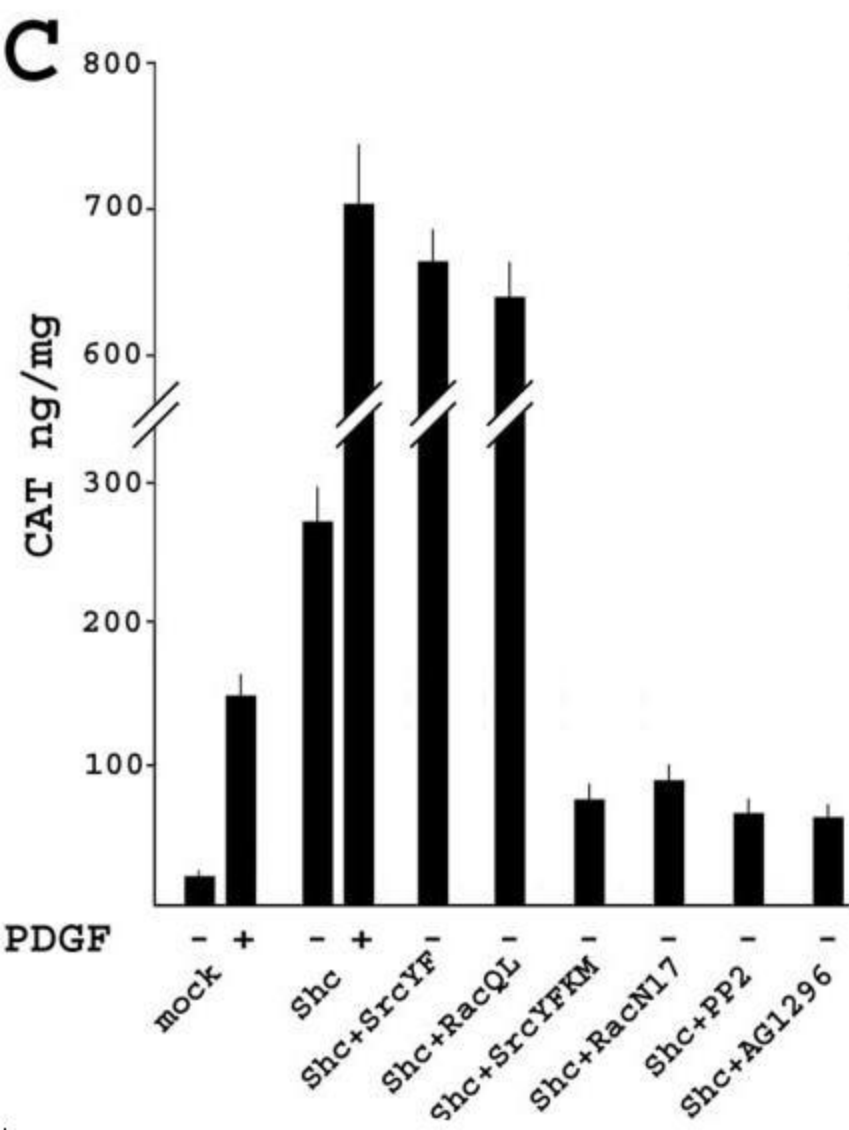
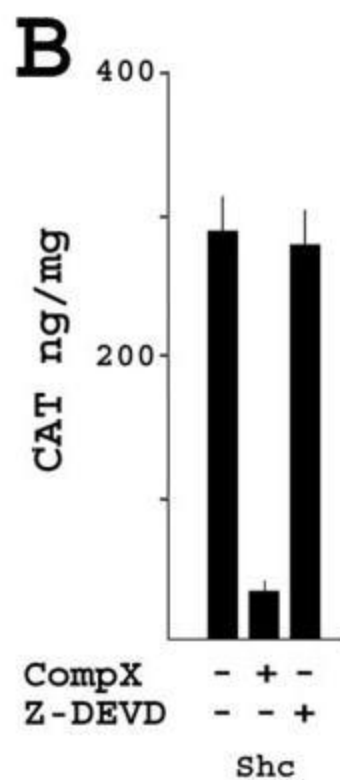
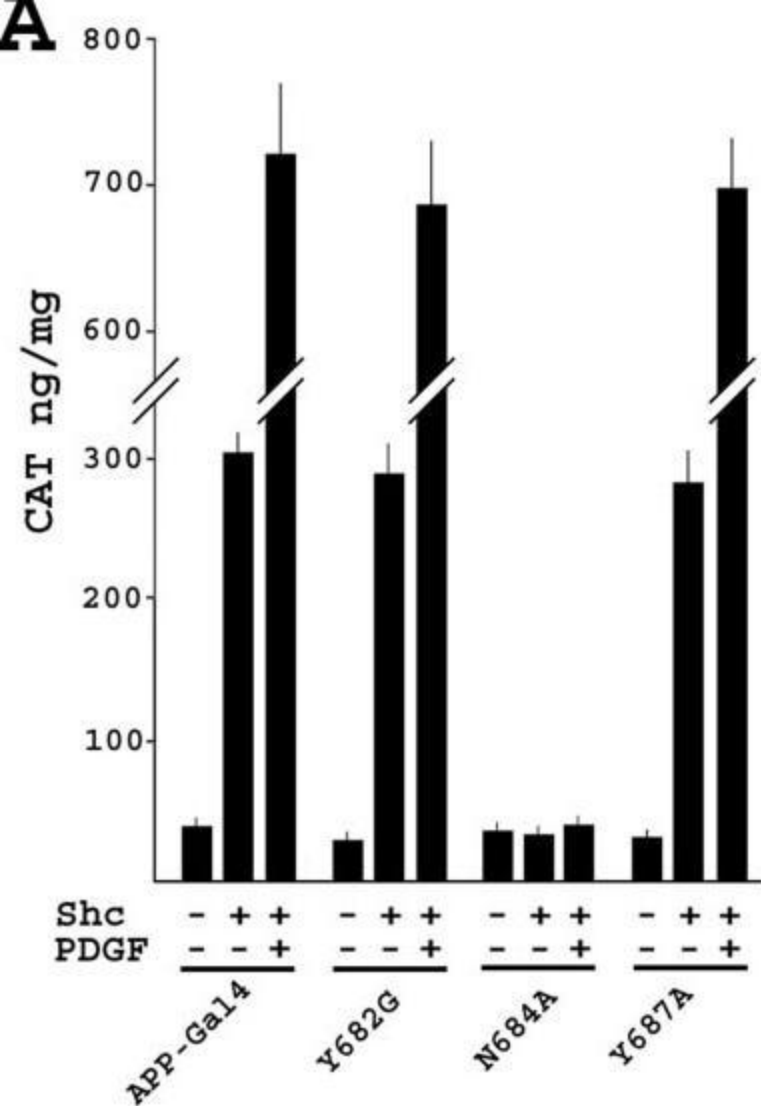


Figura 18

Fe65 Is Not Involved in the Platelet-derived Growth Factor-induced Processing of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein, Which Activates Its Caspase-directed Cleavage*

Received for publication, October 7, 2003, and in revised form, January 20, 2004
Published, JBC Papers in Press, February 6, 2004, DOI 10.1074/jbc.M311027200

Nicola Zambrano[‡], Davide Gianni[‡], Paola Bruni[§], Fabiana Passaro, Francesca Telese,
and Tommaso Russo[¶]

From the Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Ceinge Biotecnologie Avanzate I-80131 Napoli, Italy

The proteolytic processing of the precursor of the β -amyloid peptides (APP) is believed to be a key event in the pathogenesis of Alzheimer's disease. This processing is activated through a pathway involving the PDGF receptor, Src, and Rac1. In this paper, we demonstrate that this pathway specifically acts on APP and requires the YENPTY motif present in the APP cytosolic domain. Considering that several results indicate that the adaptor proteins interacting with this domain affect the processing of APP, we examined their possible involvement in the PDGF-induced pathway. By using an APP-Gal4 reporter system, we observed that the overexpression of Fe65 activates APP-Gal4 cleavage, whereas X11 stabilizes APP. Although mDab1 and Jip1 have no effect, Shc induces a strong activation of APP cleavage, and the contemporary exposure of cells to PDGF causes a dramatic cooperative effect. The analysis of point mutations of the APP YENPTY motif indicates that Fe65 and PDGF function through different mechanisms. In fact, Fe65 requires the integrity of APP695 Tyr⁶⁸² residue, whereas PDGF effect is dependent upon the integrity of Asn⁶⁸⁴. Furthermore, the mutation of Asp⁶⁶⁴ of APP, which is the target site for the caspase-directed APP cleavage, strongly decreases the effect of Fe65. This suggests that Fe65 activates the cleavage of APP by caspases, and in fact, caspase inhibitor Z-VEVD decreases the APP cleavage induced by Fe65. On the contrary, the effects of Shc overexpression, like those of PDGF, are completely absent in the presence of compound X and require the integrity of the Asn⁶⁸⁴ residue of APP695. The involvement of Shc in the pathway regulating APP processing is confirmed by the effects of constitutively active and dominant negative mutants of Src and Rac1.

Numerous experimental results indicate that the β -amyloid precursor protein (APP)¹ plays a crucial role in the pathogen-

esis of Alzheimer's disease (AD). In fact, the main constituent of senile plaques, the β -amyloid peptide ($A\beta$), derives from the proteolytic processing of APP, and mutations of the APP gene are responsible for some rare cases of genetically inherited AD. Furthermore, presenilins are key factors of the molecular machinery catalyzing the cleavage of APP, and mutations of the two presenilin genes are responsible for most of the cases of familial AD (for reviews, see Refs. 1 and 2).

It is well demonstrated that APP is a type I membrane protein that is cleaved by two different proteolytic enzymes, named α - and β -secretases. These cleavages generate soluble extracellular fragments, named α - and β -APPs, and two forms of transmembrane stubs, Cys⁸³ and Cys⁹⁹, as a consequence of the activity of α - and β -secretases, respectively. These stubs are then substrates of a third enzyme, the γ -secretase, which cleaves them within the transmembrane helix, thus generating from Cys⁹⁹ the 40–42 amino acid-long peptide $A\beta$ and from Cys⁸³ a smaller fragment named p3. The cleavage of Cys⁸³ and Cys⁹⁹ by γ -secretase also results in the generation of a C-terminal peptide of 57 residues (APP intracellular domain, AICD) (3, 4). APP is also a substrate of caspase activities that cleave its cytosolic domain, 31 residues upstream from the C terminus (5).

Numerous results suggest that the short cytodomain of APP plays a key role in the regulation of these events. In fact, this cytodomain contains a YENPTY motif that interacts with several PTB-containing adaptor proteins, such as those belonging to the Fe65 protein family (6–8), X11 (9), mDab1 (10), Jip1 (11), Shc (12, 13), and Numb (14). Among these proteins, X11 stabilizes APP, preventing its cleavage by α - and β -secretases (15, 16), whereas Fe65 overexpression, at least in some cells, increases the generation of $A\beta$ (17). Furthermore, the APP cytodomain interacts with other proteins, such as kinesin-I (18) and PAT1 (19) and is phosphorylated by Abl tyrosine kinase at the Tyr⁶⁸² residue (20) and by various enzymes at Thr⁶⁶⁸ (21).

The functions of APP and its proteolytic processing are still unclear. Several results indicated that APP could be considered a cargo receptor for kinesin-I because of its interaction with the light chain subunit of this motor protein (18). Fast anterograde axonal transport of presenilin-1 is dependent upon APP, and kinesin-I and the latter are involved in the transport of the vesicle compartment where the secretase-directed processing of APP occurs (22). Additionally, the proteolytic processing of APP recalls that of another membrane protein named Notch, whose

* This work has been supported by grants from the Italian Ministry of Health-Regione Campania (Progetto Alzheimer), Miur-FIRB RBNE01WY7B from Biogem-Italy, European Community Grant CT-2003-503330 (to T. R.), and MIUR-PRIN 2003 (to N. Z.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[‡] Both authors contributed equally to this work.

[§] Recipient of a Biogem fellowship.

[¶] To whom correspondence should be addressed: Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, I-80131 Naples, Italy. Tel.: 3908-1746-3131; Fax: 3908-1746-4359; E-mail: russot@dbbm.unina.it.

¹ The abbreviations used are: APP, amyloid precursor protein; AD,

Alzheimer's disease; $A\beta$, beta-amyloid peptide; AICD, APP intracellular domain; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; Z-D(or V)EVD-fmk, benzyloxycarbonyl-D(or V)EVD-fluoromethyl ketone; IC, intracellular; PTB, phosphotyrosine binding domain; PDGF, platelet derived growth factor; PDGF-R, PDGF receptor.

intracellular domain is released from the membrane upon a γ -secretase cleavage and is translocated into the nucleus where it associates with the transcription machinery and regulates several genes, in association with other transcription factors (for a review, see Ref. 23). The similarity between APP and Notch is strengthened by the observations that AICD has been also found in the nucleus (24–25) and that a complex containing AICD, the adaptor protein Fe65, and the histone acetyl transferase Tip60 are able to activate the transcription of a reporter gene (26) and are found associated with active chromatin on the promoter of the KAI1 gene (27). The possibility that APP could regulate nuclear functions is further supported by results indicating that Fe65, one of the cytosolic ligands of APP, is a nuclear protein (28) interacting, further than with Tip60, with the late Simian virus 40 transcription factor (LSF) and regulating the expression of the thymidylate synthase and GS3K β genes (29–30). Furthermore, AICD also interacts with JIP1 and X11; in these cases, it could also be involved in gene regulation (31–32). Therefore, it has been hypothesized that the cleavage of APP by α - and/or β -secretases and the resulting cleavage of Cys⁸³ or Cys⁹⁹ by γ -secretase result in the release of AICD from the membrane anchor and in its translocation into the nucleus, where, in association with other proteins, it could regulate gene transcription.

The attractiveness of this hypothesis would be increased if the cleavage of APP and the resulting gene regulation could be triggered by events, such as extracellular signals, thus assigning to APP a role in signal transduction. We have demonstrated recently that APP processing is induced by activated PDGF receptor through a pathway involving the activation of Src and Rac1 (33). In this paper, we demonstrate that some partners of the APP cytodomain play a key role in the regulation of APP processing. In particular, Fe65 and Shc increase the cleavage of APP by two different mechanisms: Fe65 induces the caspase-dependent cleavage of APP, whereas Shc cooperates with PDGF in the activation of the secretase-directed processing of APP.

MATERIALS AND METHODS

DNA Constructs—The APP-Gal4 construct and the CAT reporter construct controlled by Gal4 cis-elements (G5B-CAT) have been described (33). N-terminal mutants of APP-Gal4 were generated in a Gal4 expression cassette obtained by cloning a PCR fragment of the yeast Gal4 cDNA between the sites NotI and ApaI of the pRcCMV vector (Invitrogen). The primers used to amplify Gal4 were: 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTAAAGCTACTGTCTTCT-ATCGAACAAAGC and 5'-CATCGGGCCCTTACTCTTTTTTTGGGTTTGGTGGGG. To ensure the proper membrane location of the deleted proteins, the coding sequence of the APP signal peptide was added to the 5' end of the vector polylinker by cloning (in the HindIII site) a double-stranded synthetic oligonucleotide with a modified 5' Hind III sequence (the upper strand sequence was: 5'-AGCTAAGCCAT-GCTGCCCGTTTGGCACTGCTCTGCTGGCCGCTGGAGCGCTC-GGGCGCTGA). Next, the PCR fragments encoding the N-terminal portions of the human APP695 cDNA used in this study were obtained with the forward primers D19–119, 5'-CCCAAGCTTGGTGAGTTTGTAAAGTGATGCCCTTC; D19–260, 5'-CCCAAGCTTCCCTACGAAGAAGCCA-CAGAGAG; D19–467, 5'-CCCAAGCTTCACTCTCTCTCCCTGCTCA-CAAC; and D19–581, 5'-CCCAAGCTTGGTTGACAAATATCAAGAC-GGAGG. The reverse primer, common to all N-terminal mutants, was 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTGCATCTGCTCAAAGAAGCTTG.

The C-terminal deletion mutants have been amplified by PCR with the common forward primer, 5'-CCCAAGCTTACTAAGGCCATGCT-GCCCGTTTGGCACTGTC, and with the reverse primers DC07, 5'-A-AGGAAAAAAGCGGCCGCTTGTAGGTTGGATTTTCTGTCACGGC; DC14, 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTGTGTCATCTTG-GAC; and DC44, 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTTCTCTTCTT-AGCATCACCAAGG.

The PCR products of the N- and C-terminal deletions, obtained from a human APP695 cDNA template, have been cloned in the Gal4/signal peptide cassette between the Hind III and NotI sites.

The point mutations were introduced in the wild-type APP-Gal4

construct through site-directed mutagenesis (Stratagene mutagenesis kit) with complementary primer pairs bearing the desired mutations. The sequences of the corresponding forward primers were Y682G, 5'-CCAAGATGCAGCAGAACGGCGCGGAAATCCAACCTACAAGTTC-TTTG; N684A, 5'-AAGATGCAGCAGAACGGCTACGAACTCCAACC-TACAAGTTCTTTGAGCA; Y687A, 5'-CGGCTACGAAAATCCAACCG-CCAAGTTCCTTTGAGCAGATGC; D664N, 5'-GGTGTGGTGGAGG-TTACGCCGCTGTCACC. The underlined nucleotides represent the mutated positions.

Fe65, Fe65C655F, Fe65 Δ -PTB (28), SrcYF, SrcYFKM, RacN17, and RacQL (33), X11 (9), Notch, Notch Δ E, cbl1-Luc (34), myc-tagged ShcA (35), and Jip-1 (11) vectors have been described. m-Dab1 construct was generated in the pRcCMV vector from the m-Dab1 cDNA.

Cell Culture Conditions, Transfections, and Treatments—HEK293, HeLa, and HeLaAG cells were grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen). Transfections were performed by calcium phosphate-DNA co-precipitation with equal amounts of plasmid DNA in 60-mm cell culture dishes. PDGF stimulation of transfected cells was started 24 h after transfection and allowed to proceed for 16–24 h in the presence of 40 ng/ml of recombinant human PDGF-BB (Sigma). Treatments of the cell cultures with the inhibitors were performed for the indicated times at the following concentrations: 10 μ M PP2 (Calbiochem), 2 μ M AG1296 (Calbiochem), 10 μ M secretase inhibitor compound X (Calbiochem), 50 μ M Z-DEVD-fmk (Alexis).

Preparation of Cell Extracts, Western Blotting, Reporter Analyses, and A β Assay—For Western blot analyses, cells were harvested in cold PBS, resuspended in lysis buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) in the presence of a protease inhibitor mixture (complete EDTA-free, Roche Applied Science) and kept on ice for 15 min. Then the extracts were clarified by centrifugation at 14,000 rpm at 4 °C. 20 μ g of each extract were resolved on 4–12% SDS-polyacrylamide gradient gels (Invitrogen) under reducing conditions and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). Filters were blocked in 5% nonfat dry milk in T-PBS solution (phosphate-buffered saline and 0.05% Tween) and incubated overnight at 4 °C with appropriate dilutions of primary antibodies. The excess antibody was removed by sequential washing of the membranes in T-PBS, and then a 1:5000 dilution of the appropriate secondary antibody (conjugated horseradish peroxidase) was added to the filters for 30 min at room temperature. The excess was removed by sequential washing of the membranes in T-PBS, and the signals were detected by chemiluminescence, using the ECL system (Amersham Biosciences). The antibodies used and their dilutions were: anti-APP 6E10 (Sigma), 1:1000; anti-APP CT695 (Zymed Laboratories Inc.), 1:250; anti-Fe65 (36), 1:2000; anti-caspase 3 (Upstate Biotechnology), 1:1000.

CAT expression was measured by using colorimetric CAT enzyme-linked immunosorbent assay (Roche Applied Science). Transiently transfected HeLa cells were harvested in cold TEN buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), lysed by freezing at –80 °C and rapid thawing at room temperature, and resuspended in lysis buffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM dithiothreitol, 5% glycerol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 400 mM NaCl). Total extracts were clarified by centrifugation at 14,000 rpm at 4 °C, and their protein concentration was determined by the Bio-Rad protein assay. For CAT concentration measurement, 150 μ g of each protein extract were used. Luciferase assays were carried out as described (29), using a Berthold tube luminometer.

A β 1–40 was assayed in triplicates from conditioned media of HEK293 cells transiently transfected with APP695 and with Shc p46, Fe65, or SrcYF. 48 h after transfection, 100 μ l of culture media were harvested and assayed with an EIA kit (IBL, Gunma, Japan), according to the instructions of the manufacturer.

RESULTS

The Cytodomain of APP Is Required for the PDGF-induced Cleavage of APP-Gal4—To examine the structural constraints of APP that are necessary to allow PDGF to induce APP processing, we have generated a series of deletion mutants of the extracellular/intraluminal domain of APP, and these cDNAs have been cloned in frame with that encoding the whole Gal4 transcription factor. These constructs, under the control of the cytomegalovirus promoter, direct the expression of fusion proteins in which Gal4 is fused at the C terminus of APP deletion mutants, all possessing a signal peptide to obtain the proper

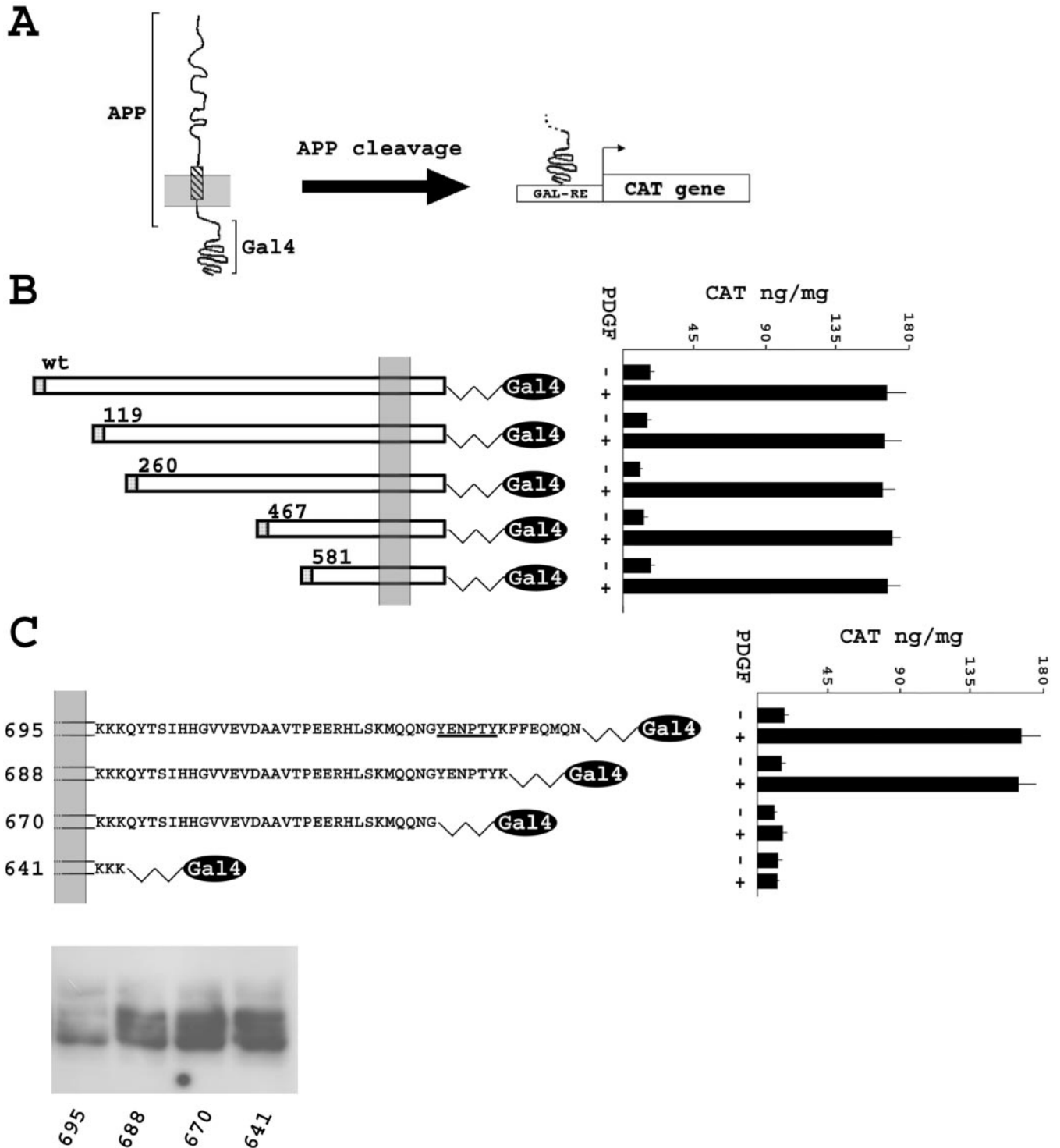


FIG. 1. The cytodomain of APP is required for PDGF-induced cleavage of APP-Gal4. *A*, schematic representation of the experimental system: upon the cleavage of APP-Gal4 fusion proteins, the Gal4 protein is released from the membrane and activates the transcription of the CAT gene cloned under the control of five Gal4 cis-elements. *B*, HeLa cells were transiently co-transfected with G5BCAT vector and expression vectors encoding APP-Gal4 fusion proteins bearing the indicated deletions of the APP EC/IL domain. 24 h after transfection, the cells were exposed or not for 24 h to 40 ng/ml recombinant human PDGF-BB. The sequence of the YENPTY motif is *underlined*. Standard deviations of triplicate CAT measurements are reported. *C*, HeLa cells were transfected and analyzed as in *B* to study the indicated deletion mutants of the cytodomain of APP. *Insert*, Western blot of the three mutant proteins (688, 670, 641) demonstrating that their expression is comparable with that of the wt APP-Gal4 (695).

membrane location. These expression vectors were transfected in HeLa cells together with G5B-CAT vector driving CAT expression under the control of five Gal4 responsive elements (see Fig. 1A); thus, the measurement of CAT functioning as a read-out of the cleavage of APP (33). 24 h after transfection, the cells were treated or not with PDGF to assess the ability of the

growth factor to induce the processing of each construct. As shown in Fig. 1B, all of the deletion mutants of the extracellular/intraluminal domain are responsive to PDGF treatment to the same extent, thus indicating that this domain of APP is not involved in the response to PDGF. An additional deletion mutant, represented by Cys⁹⁹ fused to Gal4, was not suitable for

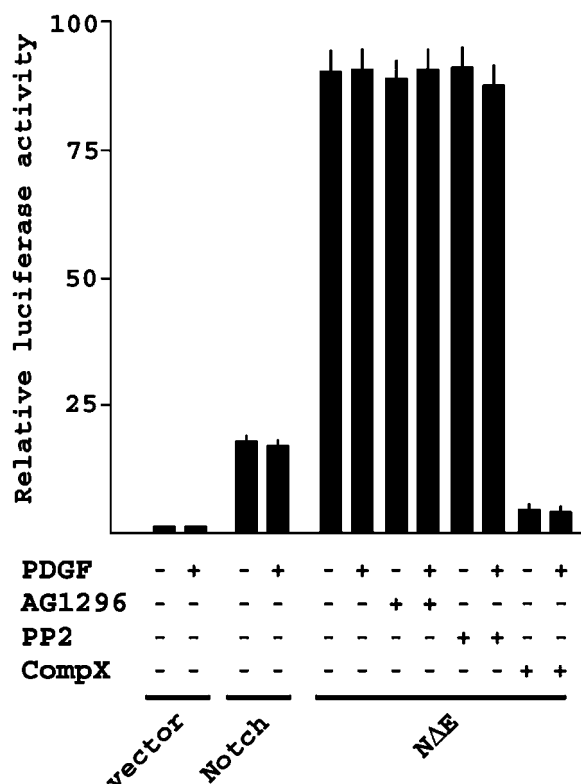


FIG. 2. PDGF treatment has no effect upon Notch processing. HeLa cells were transiently co-transfected with *cbf1-luc* vector and with expression vectors encoding Notch or its deletion mutant Notch Δ E (N Δ E). 24 h after transfection, the cells were exposed or not for 24 h to 40 ng/ml recombinant human PDGF-BB and, as indicated, to 2 μ M PDGF-R inhibitor AG1296, 10 μ M Src inhibitor PP2, or 10 μ M γ -secretase inhibitor compound X. Standard deviations of triplicate luciferase measurements are reported.

this experiment, given the high basal level of CAT protein observed upon transfection, regardless of the treatment with PDGF. Similarly, three deletion mutants of the intracellular (IC) domain of APP have been generated and cloned in-frame with the whole Gal4 protein. The analysis of these deletion mutants allowed us to observe that the removal of the C-terminal 14 residues of APP results in the abolition of the responsiveness to PDGF (see Fig. 1C). This result is in agreement with those demonstrating that the deletion of the YENPTY motif present in this region abolishes the β -secretase-mediated processing of APP and strongly decreases A β production (37).

PDGF Specifically Activates the Secretase-directed Processing of APP—The abolition of the PDGF effect on APP-Gal4 processing observed in APP mutants lacking part of the cytodomain suggests that the PDGF-Src-Rac pathway could specifically activate the processing of APP and not that of other γ -secretase substrates lacking specific signals present in APP. To address this point, we examined the effects of the PDGF-activated pathway on Notch, another substrate of the secretase machinery. To do this, we transfected HeLa cells with Notch or with its deletion mutant, Notch Δ E, together with a plasmid in which the luciferase gene is transcribed under the control of *cbf-1* cis-elements. As shown in Fig. 2, in cells transfected with the entire Notch protein, the expression of the reporter gene was not activated by the PDGF treatment, and in cells transfected with Notch Δ E, which is a substrate of γ -secretase (34), the treatments with the PDGF-R inhibitor AG1296 or with the Src inhibitor PP2 had no effect. As expected, however, the γ -secretase inhibitor, compound X, completely inhibited luciferase gene expression. These results support the hypothesis of

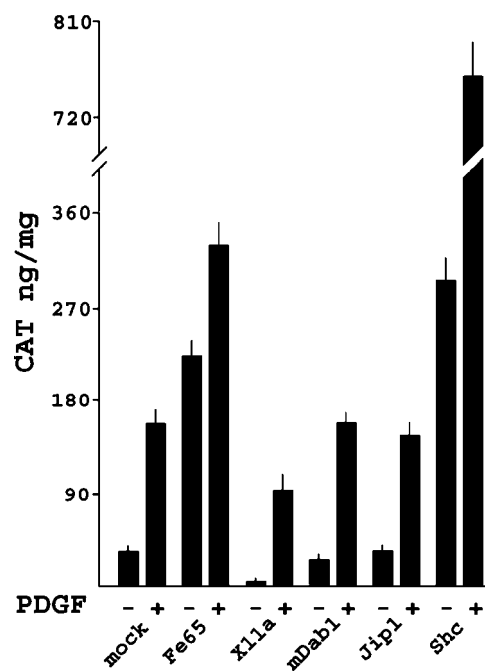


FIG. 3. Fe65, X11, and Shc overexpression affects the cleavage of APP-Gal4. HeLaAG cells, stably expressing APP-Gal4 protein, were transiently co-transfected with G5B-CAT plasmid and with vectors driving the expression of Fe65, X11, mDab1, JIP1, or Shc or with empty vector. 24 h after transfection, the cells were exposed or not to recombinant PDGF-BB for an additional 24 h. Standard deviations of triplicate CAT measurements are reported.

a specific effect of the PDGF on APP processing. Considering the results reported in Fig. 1C, it is possible that one or more specific ligands of the APP cytodomain could play a role in the induction of APP cleavage by PDGF.

Adaptor Proteins Interacting with the Cytodomain of APP Affect the PDGF-induced Cleavage of APP-Gal4—The region of the APP cytodomain, whose deletion causes the abolition of the response to PDGF, contains the YENPTY motif that is known to interact with several different PTB-containing proteins. To evaluate the role of these molecules on APP-Gal4 cleavage induced by PDGF, HeLaAG cells, stably expressing APP-Gal4 (33), were transfected with vectors driving the expression of Fe65, X11 α , mDab1, JIP1, or Shc and then treated or not with PDGF-BB. As shown in Fig. 3, some of these proteins have a significant effect on CAT accumulation, either in the presence or absence of PDGF treatment. The overexpression of Fe65 results in an accumulation of CAT that is higher than that previously observed after PDGF treatment. The exposure to PDGF of Fe65-transfected cells let us observe even higher levels of CAT, but lower than those expected if the CAT accumulation due to PDGF treatment is simply summed to that because of Fe65 overexpression alone. On the contrary, CAT expression upon PDGF treatment in X11 α -transfected HeLaAG cells was significantly lower than that observed in cells not overexpressing X11. Finally, although mDab1 and JIP1 have no evident effect upon PDGF-induced APP-Gal4 cleavage, the consequences of Shc transfection were dramatic. In fact, the levels of CAT reached in cells transfected with Shc vector were two times higher than those observed in mock-transfected cells exposed to PDGF. More importantly, PDGF and Shc seem to act cooperatively, given the very high levels of CAT measured when Shc-transfected cells were exposed to PDGF.

Fe65-induced Cleavage of APP-Gal4 Is Independent from the Pathway Activated by PDGF—We first explored the effects of Fe65 and asked whether these effects are due to the interaction of Fe65 with APP. To this aim, we transfected HeLaAG cells

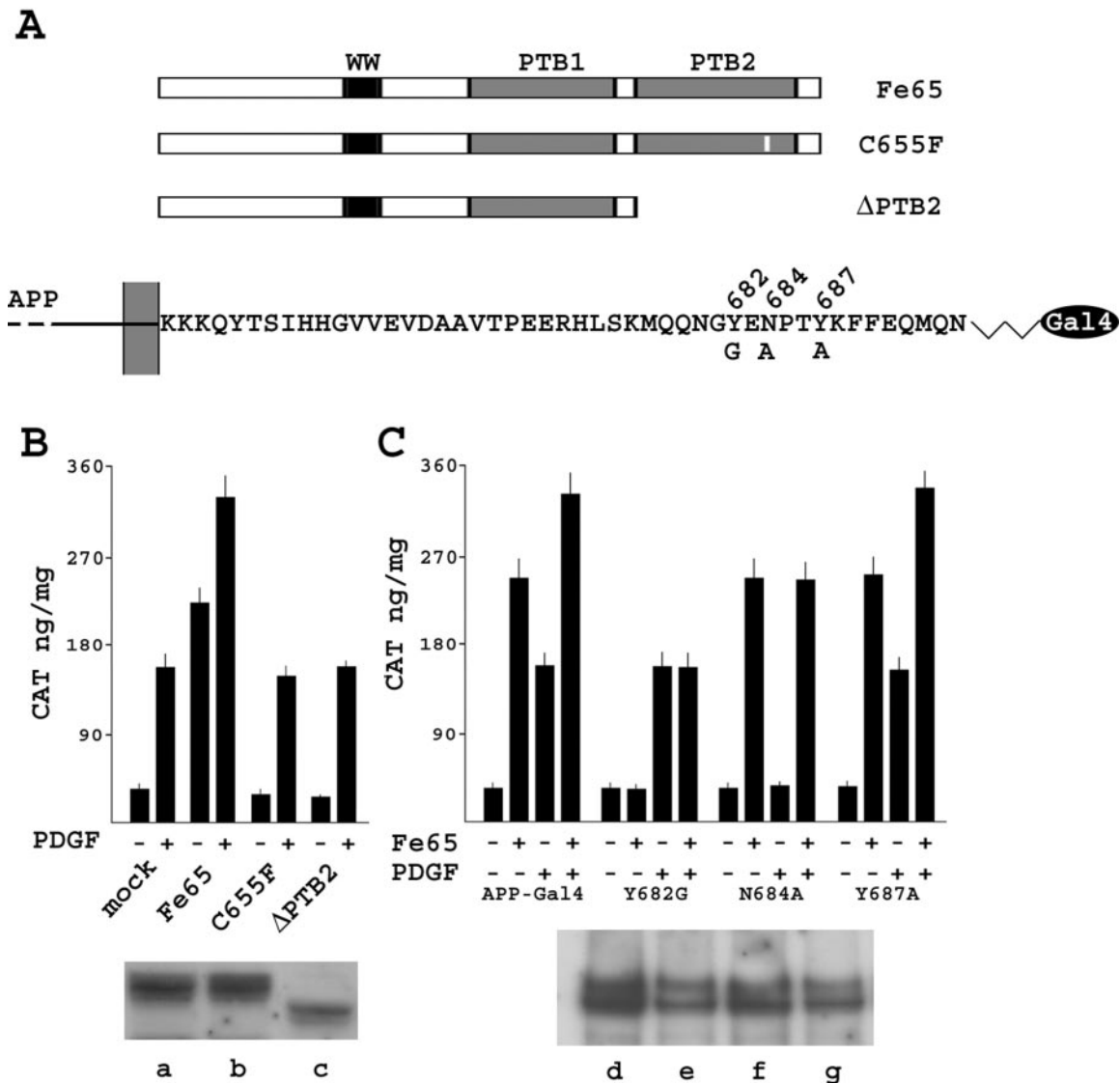


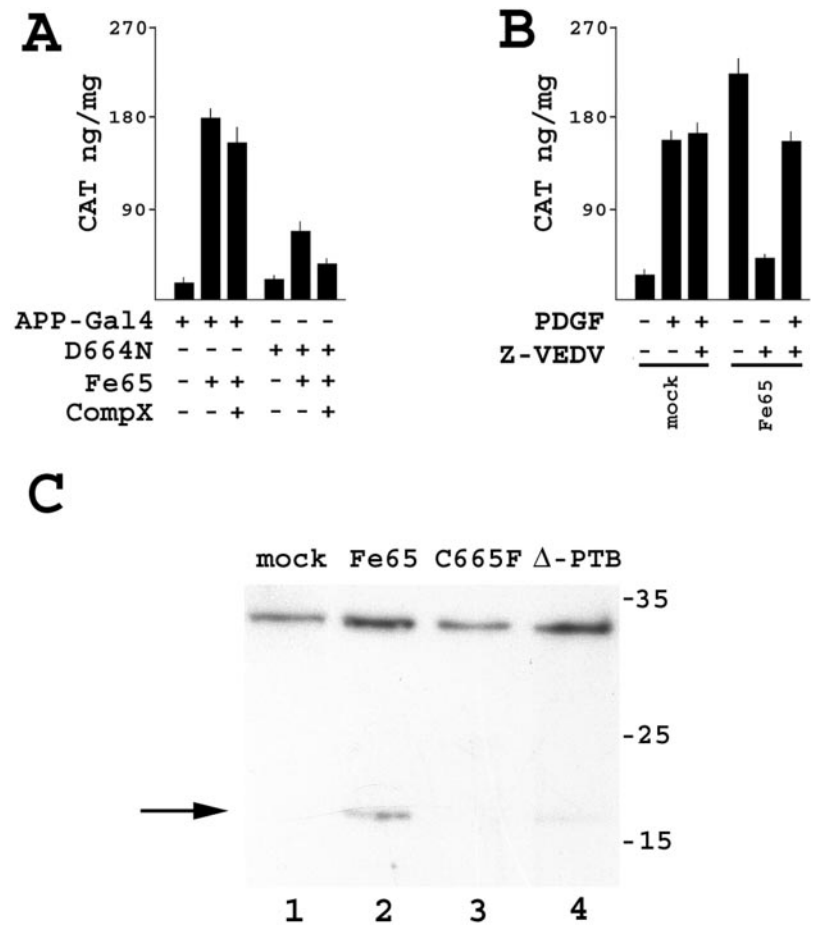
FIG. 4. Fe65 induces the cleavage of APP-Gal4 through a pathway different from that activated by PDGF. *A*, the constructs used in these experiments were two Fe65 mutants, C655F and Δ PTB2, and three APP-Gal4 mutants, Y682G, N684A, and Y687A. The first two mutants bear the point mutation of the cysteine 655 into phenylalanine and the deletion of the C-terminal PTB domain, respectively, whereas in the APP-Gal4 mutants, tyrosine 682 is changed into glycine, and asparagine 684 and tyrosine 687 are changed into alanine. *B*, HeLaAG cells, stably expressing APP-Gal4 protein, were transiently co-transfected with G5B-CAT plasmid and with vectors driving the expression of wild-type rat Fe65 or mutant Fe65, which is unable to interact with APP. 24 h after transfection, the cells were exposed or not to recombinant PDGF-BB for an additional 24 h. *Inset*, Western blot of the two Fe65 mutant proteins used, demonstrating that their expression is comparable with that of the wt Fe65 (*a*, wt Fe65; *b*, C655F; *c*, Δ PTB2). *C*, HeLa cells were transfected with G5B-CAT and APP-Gal4 or mutant APP-Gal4 Y682G, N684A, and Y687A. Cells were also transfected with Fe65 and/or exposed to PDGF where indicated. *Inset*, Western blot of the three APP-Gal4 mutant proteins used, demonstrating that their expression is comparable with that of the wt APP-Gal4 construct (*d*, wt APP-Gal4; *e*, Y682G; *f*, N684A; *g*, Y687A). Standard deviations of triplicate CAT measurements are reported in all of the panels.

with mutant forms of Fe65 lacking the PTB2 domain, which is involved in the interaction with APP, or bearing a point mutation in the PTB2 domain (C655F), which is known to prevent the formation of the Fe65-APP complex (8, 27). These two mutant proteins were completely devoid of activity, as demonstrated by the fact that CAT does not accumulate upon their transfection. Furthermore, PDGF treatment has the same effect on mock-transfected HeLaAG cells and in cells transfected with Fe65 mutants, thus suggesting no dominant-negative effect of these mutant proteins on PDGF-induced pathway (see Fig. 4*B*). The observation that the effects of Fe65 and those of PDGF are not cooperative suggests that Fe65 could induce the cleavage of APP-Gal4 through a pathway different from that activated by PDGF. This possibility is supported by the analysis of the effects of PDGF treatment or of the Fe65 overexpression on the cleavage of APP-Gal4 proteins, bearing point

mutations of the YENPTY motif. In fact, as shown in Fig. 4*C*, the mutation of the Tyr⁶⁸² residue, which is known to prevent the binding of Fe65 (8), completely abolishes the effect of Fe65 overexpression, whereas the mutations of Asn⁶⁸⁴ and Tyr⁶⁸⁷ residues, which are compatible with the formation of Fe65-APP complex (8), have no effect on the cleavage induced by Fe65. On the contrary, the mutation of Tyr⁶⁸² does not affect the cleavage of APP-Gal4 induced by PDGF, whereas the mutation of Asn⁶⁸⁴ completely abolishes the PDGF-induced cleavage.

Fe65 Induces the Cleavage of the APP C-terminal Domain by Caspase 3—The cleavage of APP-Gal4 induced by PDGF treatment is completely prevented by the γ -secretase inhibitor compound X (33). In HeLa cells transiently transfected with APP-Gal4 and Fe65, compound X treatment only decreases the cleavage of APP-Gal4 induced by Fe65 (see Fig. 5*A*), and no significant effect was seen in HeLaAG cells (data not shown).

FIG. 5. Fe65-induced cleavage of APP-Gal4 is dependent upon caspase activity. *A*, HeLa cells were transfected with G5B-CAT and APP-Gal4 or mutant APP-Gal4 D664N, with or without Fe65 expression vector, in the presence or in the absence of γ -secretase inhibitor compound X (as indicated). *B*, HeLaAG cells stably expressing APP-Gal4 protein were transiently co-transfected with G5B-CAT plasmid, with or without the vector driving the expression of wild-type rat Fe65. 24 h after transfection, the cells were exposed or not to recombinant PDGF-BB for an additional 24 h in the presence or absence of the caspase inhibitor Z-VEDV-fmk. Standard deviations of triplicate CAT measurements are reported in both the panels. *C*, Western blot with caspase3 antibody (Upstate Biotechnology) of extracts from HeLa cells transfected with APP-Gal4 and with empty vector (*lane 1*), wt Fe65 (*lane 2*), mutant Fe65 C665F (*lane 3*), or Δ -PTB2 (*lane 4*). The arrow indicates the cleaved form of caspase 3.



These results suggest that the main mechanism responsible for the effects of Fe65 overexpression is not the γ -secretase-directed cleavage. Another possible mechanism through which Fe65 could induce the release of AID-Gal4 from the membrane is the cleavage of APP cytodomain by caspases. It was, in fact, demonstrated that several caspases are able to cleave APP between Asp⁶⁶⁴ and Ala⁶⁶⁵ (5). On this basis, we generated an APP-Gal4 mutant in which the Asp⁶⁶⁴ is mutated into an asparagine residue and demonstrated that this mutation significantly inhibits the cleavage observed as a consequence of Fe65 overexpression (Fig. 5A). The residual ability of Fe65 to induce the cleavage of the APP-D664 mutant is counteracted by the γ -secretase inhibitor compound X, thus indicating that Fe65 may also induce the APP cleavage by this enzyme when the caspase-directed cleavage is prevented. In accord with these results, we observed that a caspase-3 inhibitor, Z-DEVD-fmk, inhibits the Fe65-induced CAT accumulation and APP-Gal4 cleavage, whereas it has no effect on the PDGF-induced phenomenon (see Fig. 5B).

There are several results indicating that caspase-mediated cleavage of APP cytodomain takes place in various experimental conditions, and the accumulation of APP itself induces caspase-3 activation in neuronal cells (38). In HeLaAG cells expressing APP-Gal4 protein, no induction of caspase-3 was observed, whereas the contemporary expression of APP-Gal4 and Fe65 is accompanied by the activation of caspase-3 (see Fig. 5C). FACS analysis excluded the possibility that Fe65 overexpression induces any HeLaAG cell apoptosis, and this is in agreement with the absence in these cells of any poly(ADP-ribose) polymerase cleavage (not shown).

Shc and PDGF-BB Cooperatively Induce APP Processing—As shown in Fig. 3, Shc overexpression in HeLaAG cells

causes a great increase of CAT gene transcription, and the contemporary treatment of transfected cells with PDGF results in a cooperative effect leading to a massive CAT accumulation. This observation suggests that Shc and PDGF act through the same mechanism, and this possibility is strongly supported by the results of the co-transfection of Shc with the mutant APP-Gal4 constructs shown in Fig. 6A. In fact, only the mutant APP-Gal4, in which asparagine 684 is changed into alanine, failed to be sensitive to both Shc transfection with or without PDGF treatment, thus showing the identical behavior observed in the experiment of Fig. 4C. Furthermore, the effects of Shc are prevented by the treatment of HeLaAG cells with the γ -secretase inhibitor compound X (see Fig. 6B), as observed in the same cells treated with PDGF, and not by the caspase inhibitor Z-DEVD-fmk, which inhibits the Fe65-induced effects (see Fig. 5B).

We demonstrated previously that PDGF induces the cleavage of APP through a pathway that includes Src and Rac1 (33). To ascertain whether Shc also takes part in the same pathway, we co-transfected HeLaAG cells with Shc and with constitutively active (SrcYF and RacQL) or dominant-negative mutants (SrcYFKM and RacN17) of Src and Rac1. As shown in Fig. 6C, SrcYF and RacQL act cooperatively with Shc, mimicking the behavior of PDGF, whereas the co-transfection with Shc of the two dominant-negative mutants of Src and Rac1 results in a strong inhibition of the effects of Shc. A similar inhibition was also observed in HeLaAG cells transfected with Shc and treated with the PDGF-R inhibitor AG1296 and the Src inhibitor PP2.

We demonstrated previously that PDGF and Src activate the processing of APP through the consecutive action of β - and γ -secretases (33). To support the finding that Shc activates the

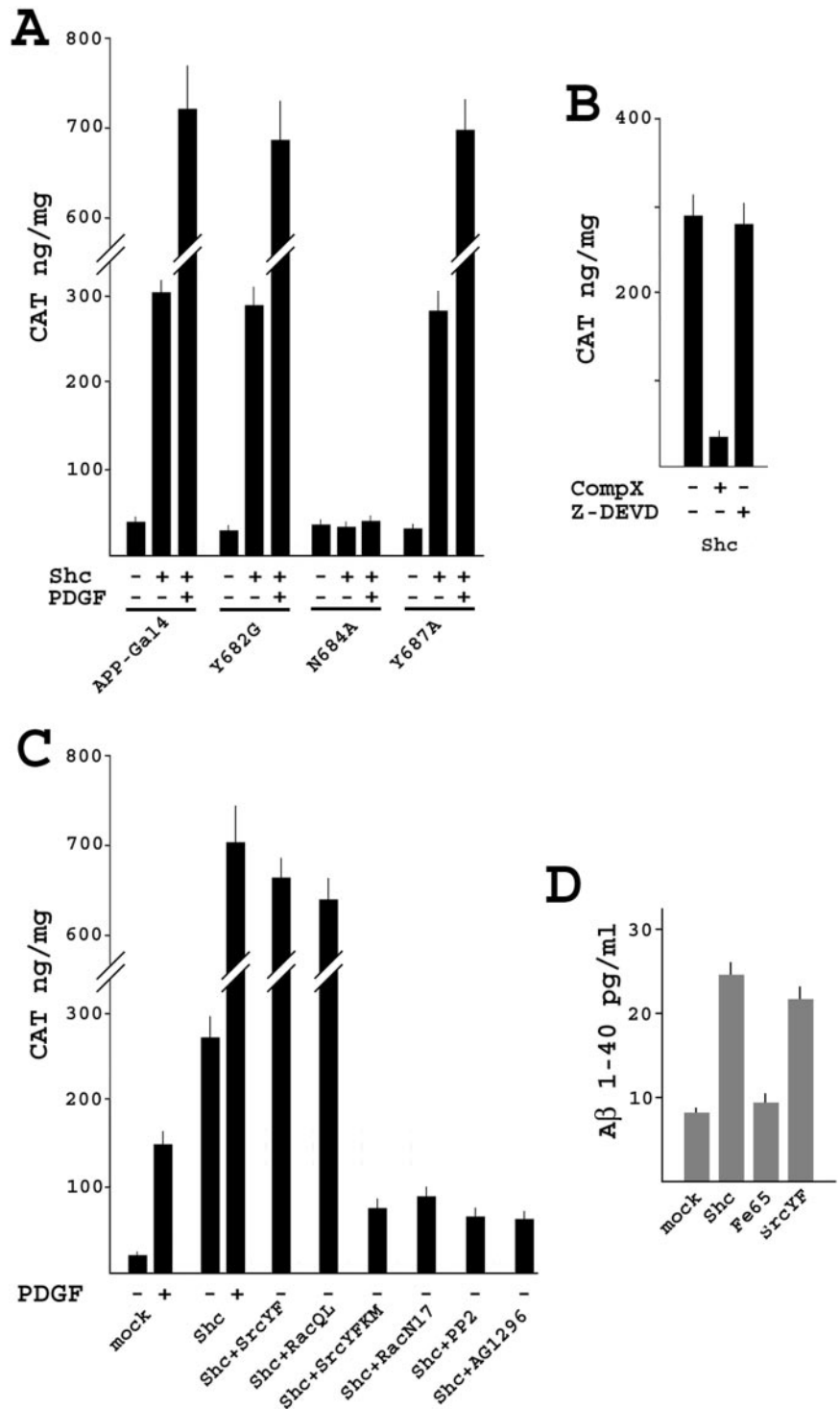


FIG. 6. Shc acts in the same pathway activated by PDGF. A, HeLa cells were transfected with G5B-CAT and APP-Gal4 or mutant APP-Gal4 Y682G, N684A, and Y687A. Cells were also transfected with Shc p46 vector and/or exposed to PDGF where indicated. B, HeLa cells were transfected with G5B-CAT, APP-Gal4, and Shc and treated or not with γ -secretase inhibitor compound X or caspase inhibitor Z-VEDV-fmk. C, HeLa cells were transfected with G5B-CAT, APP-Gal4, and/or Shc and, where indicated, with vectors directing the expression of constitutively active forms of Src (SrcYF) and Rac1 (RacQL) or dominant-negative mutants of these two proteins (SrcYFKM and RacN17). The last two bars indicate the amount of CAT in cells transfected with APP-Gal4 and Shc and treated with Src tyrosine kinase inhibitor PP2 or PDGF-R tyrosine kinase inhibitor AG1296. Standard deviations of triplicate CAT measurements are reported in all of the panels. D, HEK293 cells were transiently transfected with human APP695 and vectors encoding the indicated proteins. A β 1-40 was measured as reported under "Materials and Methods." Standard deviations of triplicate experiments are reported. *, $p < 0.01$, indicates that the mean value is significantly different from that of the mock-transfected cells.

processing of APP through the same pathway of PDGF and Src, we measured the levels of A β peptides in HEK293 cells transfected with APP695 and/or Shc or Fe65 or the constitutively active form of Src (SrcYF). As shown in Fig. 6D, Shc transfection induced a significant accumulation of A β , similar to that observed in cells expressing SrcYF, whereas the modest increase observed after Fe65 expression was not significant.

DISCUSSION

The regulation of APP processing and A β generation is still not fully understood. Knowing the mechanisms underlying this issue would give new information useful to solving the puzzling problem of the functions of APP and which, on the other hand, could suggest new targets for the pharmacological manipula-

tion of the system. By searching for extracellular signals affecting APP processing, we found that PDGF-BB is a strong activator of the secretase-driven cleavage of APP and A β production (33). To identify the mechanisms bridging the PDGF-signaling pathway to APP, we searched for the molecular constraints of APP necessary for the PDGF-induced cleavage. Although the extracellular domain of APP seems to have no roles, the YENPTY motif present in the cytodomain of APP is absolutely necessary to allow APP to be sensitive to PDGF, in agreement with the well demonstrated role of this amino acid stretch that is involved in APP intracellular trafficking. It is, in turn, probably responsible for the targeting of APP toward the compartments where APP is cleaved (37). This YENPTY motif

is known to bind several PTB-containing molecules; thus, we asked whether the PDGF-induced cleavage of APP is affected by the overexpression of these APP ligands. The results reported in this paper indicate that two of these molecules, X11 α and ShcA, clearly affect the regulation of APP processing by PDGF. In fact, while in the presence of X11 α overexpression, the PDGF-induced cleavage of APP-Gal4 was significantly decreased, the overexpression of Shc increased *per se* the cleavage of APP-Gal4 and dramatically strengthened the effects of PDGF, suggesting a cooperation between these two molecules.

The analysis of APP-Gal4 molecules bearing point mutations in the YENPTY motif led to some interesting findings. This analysis demonstrated, in fact, that the mutation of the Asn⁶⁸⁴ residue resulted in a complete abolition of the PDGF-induced cleavage of APP-Gal4. Similarly, this mutation rendered APP-Gal4 no longer sensitive to the Shc-induced cleavage. This result confirms that Shc is acting through the same pathway activated by PDGF, but the analysis of the behavior of the Y682G mutant raises some doubts about the possibility that Shc is working as an APP ligand. In fact, it was reported that Shc interacts with APP cytodomain phosphorylated at Tyr⁶⁸² (12), but the mutation of this amino acid has no effect on both PDGF- and Shc-induced cleavage of APP-Gal4. Furthermore, although both Abl and Src are able to phosphorylate Tyr⁶⁸² of APP (Ref. 20 and unpublished results), our results suggest that this event is not required to induce APP-Gal4 cleavage. On this basis, it is possible to speculate that a further ligand of the YENPTY motif, whose binding is dependent upon the Asn⁶⁸⁴ residue, is, in the main, responsible for the targeting of APP to the secretase pathway. The observation that X11 inhibits the PDGF-induced cleavage of APP-Gal4 (see Fig. 3) is in agreement with previous results indicating that this adaptor molecule stabilizes APP by decreasing its cleavage by secretases (15–16). Considering that X11 proteins do not interact with APP bearing the mutation of Asn⁶⁸⁴ (9), one possibility that could be explored is that X11s compete for the binding to APP with the hypothesized new ligand of the YENPTY motif, sharing with it the conformational requirement of the APP cytodomain. One possible reason why the identification of this partner is still elusive could be that the experimental system used to isolate all of the known ligands of APP cytodomain, *i.e.* the two-hybrid interaction trap, fails to reveal the interactions that are dependent upon posttranscriptional modifications that do not take place in yeast.

We have also shown that the release of Gal4 from the membrane-bound APP-Gal4 and the consequent activation of the reporter gene observed in cells overexpressing Fe65 are mostly due to the cleavage of the APP cytodomain at the Asp⁶⁶⁴ caspase site. This cleavage causes the removal of the YENPTY motif of the APP cytodomain; thus, it is expected to prevent part of the APP molecules from being targeted to the endocytic compartment where A β is supposed to be generated (37). Several studies have tried to address the effect of the binding of Fe65 to APP upon the processing fate of this molecule, but the results obtained so far are contradictory. In fact, in Madin-Darby canine kidney cells, it was observed that Fe65 overexpression induces the accumulation of APP on the cell surface and, at the same time, increases A β generation (17), whereas in HEK293 cells, it induces a significant decrease of A β 40 and 42 production (39). In another study (40), the expression of Fe65L1 protein in H4 neuroglioma cells resulted in the increased secretion of soluble α APP without a measurable accumulation of A β . On the other hand, it was suggested that caspase-cleaved APP be directed to a more amyloidogenic pathway, thus increasing A β generation (41), but these findings were subsequently questioned by demonstrating that caspase

activation *per se* did not increase A β generation and that, more importantly, caspase-cleaved APP molecules show decreased internalization and A β production (42). The levels of A β generated in our experimental system are not significantly changed in the presence or in the absence of Fe65 overexpression. However, the observation that the contemporary exposure of HeLaAG cells to both Fe65 overexpression and to PDGF treatment resulted in a CAT accumulation lower than the sum of the two separate effects suggests that Fe65 overexpression subtracts APP-Gal4 molecules from the PDGF-activated pathway. On the other hand, the D664N mutation does not completely abolish the Fe65-induced CAT accumulation, thus suggesting a slight stimulatory effect of Fe65 upon secretase-dependent cleavage of APP when caspase-directed cleavage is prevented. According to this hypothesis, the residual cleavage of APP-Gal4, seen in cells expressing the APP-D664N mutant and Fe65, is blocked by the γ -secretase inhibitor.

The results presented in this paper are in agreement with recent findings (43) demonstrating that the tyrosine kinase inhibitor Gleevec prevents A β production both in cultured cells and in animals. We also report experiments demonstrating that the inhibition of the PDGF-induced pathway by Src or PDGF-R inhibitors, PP2 and AG1296, has no effects upon Notch processing, similar to that observed for Gleevec (43). Taken together, all of these results support the possibility that new therapeutic strategies could be developed based upon the inhibition of the tyrosine kinase-directed regulation of APP processing and A β generation.

Acknowledgments—We thank Massimo Santoro for Shc-expressing vector and Raphael Kopan and Brian Howell for Notch and mDab1 constructs, respectively.

REFERENCES

- Selkoe, D. J. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 741–766
- St. George-Hyslop, P. H. (2000) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **924**, 1–7
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 1857–1870
- Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D'Adamo, L. (2000) *J. Alzheimer's Dis.* **2**, 289–301
- Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Reinhard, F. B., Schuckert, O., Evin, G., and Masters, C. L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5823–5829
- Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A., and Russo, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30853–30856
- Guenette, S. Y., Chen, J., Jondro, P. D., and Tanzi, R. E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10832–10837
- Duilio, A., Faraonio, R., Minopoli, G., Zambrano, N., and Russo, T. (1998) *Biochem. J.* **330**, 513–519
- Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6229–6241
- Homayouni, R., Rice, D. S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 7507–7515
- Scheinfeld, M. H., Roncarati, R., Vito, P., Lopez, P. A., Abdallah, M., and D'Adamo, L. (2001) *J. Biol. Chem.* **277**, 3767–3775
- Tarr, P. E., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P. G., and D'Adamo, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16798–16804
- Russo, C., Dolcini, V., Salis, S., Venezia, V., Zambrano, N., Russo, T., and Schettini, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35282–35288
- Roncarati, R., Sestan, N., Scheinfeld, M. H., Berechid, B. E., Lopez, P. A., Meucci, O., McGlade, J. C., Rakic, P., and D'Adamo, L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7102–7107
- Borg, J. P., Yang, Y. N., De Taddéo-Borg, M., Margolis, B., and Turner, R. S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14761–14766
- Sastre, M., Turner, R. S., and Levy, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22351–22357
- Sabo, S. L., Lanier, L. M., Ikin, A. F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., and Buxbaum, J. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7952–7957
- Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C.-H., and Goldstein, L. S. B. (2000) *Neuron* **28**, 449–459
- Zheng, P., Eastman, J., Vande Pol, S., and Pimplikar, S. W. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14745–14750
- Zambrano, N., Bruni, P., Minopoli, G., Mosca, R., Molino, D., Russo, C., Schettini, G., Sudol, M., and Russo, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19787–19792
- Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. M., Czernik, A. J., Nairn, A. C., and Greengard, P. (1994) *EMBO J.* **13**, 1114–1122
- Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A., and Goldstein, L. S. (2001) *Nature* **414**, 643–648
- Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000) *Dev. Biol.* **228**, 151–165
- Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guenette, S. Y., and Selkoe, D. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 40288–40292
- Gao, Y., and Pimplikar, S. W. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14979–14984

26. Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001) *Science* **293**, 115–120
27. Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2002) *Cell* **110**, 55–67
28. Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N., and Russo, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 6545–6550
29. Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., Hansen, U., and Russo, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35481–35488
30. Kim, H. S., Kim, E. M., Lee, J. P., Park, C. H., Kim, S., Seo, J. H., Chang, K. A., Yu, E., Jeong, S. J., Chong, Y. H., and Suh, Y. H. (2003) *FASEB J.* **17**, 1951–1953
31. Scheinfeld, M. H., Matsuda, S., and D'Adamio, L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1729–1734
32. Biederer, T., Cao, X., Sudhof, T. C., and Liu, X. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 7340–7351
33. Gianni, D., Zambrano, N., Bimonte, M., Minopoli, G., Mercken, L., Talamo, F., Scaloni, A., and Russo, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9290–9297
34. Kopan, R., Schroeter, E. H., Weintraub, H., and Nye, J. S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1683–1688
35. Geneste, O., Bidaud, C., De Vita, G., Hofstra, R. M., Tartare-Deckert, S., Buys, C. H., Lenoir, G. M., Santoro, M., and Billaud, M. (1999) *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1989–1999
36. Zambrano, N., Buxbaum, J. D., Minopoli, G., Fiore, F., De Candia, P., De Renzis, S., Faraonio, R., Sabo, S., Cheetham, J., Sudol, M., and Russo, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6399–6405
37. Perez, R. G., Soriano, S., Hayes, J. D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D. J., Chen, X., Stokin, G. B., and Koo, E. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18851–18856
38. Uetsuki, T., Takemoto, K., Nishimura, I., Okamoto, M., Niinobe, M., Momoi, T., Miura, M., and Yoshikawa, K. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 6955–6964
39. Ando, K., Iijima, K. I., Elliott, J. I., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 40353–40361
40. Guenette, S. Y., Chen, J., Ferland, A., Haass, C., Capell, A., and Tanzi, R. E. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 985–993
41. Gervais, F. G., Xu, D., Robertson, G. S., Vaillancourt, J. P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M. S., Clarke, E. E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L. H., Ruffolo, S. C., Thornberry, N. A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R. J., Roy, S., and Nicholson, D. W. (1999) *Cell* **97**, 395–406
42. Soriano, S., Lu, D. C., Chandra, S., Pietrzik, C. U., and Koo, E. H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29045–29050
43. Netzer, W. J., Dou, F., Cai, D., Veach, D., Jean, S., Li, Y., Bornmann, W. G., Clarkson, B., Xu, H., and Greengard, P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12444–12449

Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET

Francesca Telese¹, Paola Bruni¹, Aldo Donizetti¹, Davide Gianni^{1,2}, Chiara D'Ambrosio³, Andrea Scaloni³, Nicola Zambrano¹, Michael G. Rosenfeld² & Tommaso Russo¹⁺

¹CEINGE Biotecnologie Avanzate, Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italy, ²Howard Hughes Medical Institute, University of California at San Diego, La Jolla, California, USA, and ³Proteomics and Mass Spectrometry Laboratory, ISPAAM, CNR, Naples, Italy

Fe65 protein interacts with the cytosolic domain of the amyloid precursor APP. Its possible involvement in gene regulation is suggested by numerous observations, including those demonstrating that it activates transcription. Here, we show that the Fe65 transcription activation domain overlaps with the WW domain of Fe65 and binds to the nucleosome assembly factor SET. This protein is required for the Fe65-mediated transactivation of a reporter gene. Two-step chromatin immunoprecipitation experiments demonstrate that a complex including Fe65/AICD/Tip60 and SET is associated with the KAI1 gene promoter. Suppression of SET levels by RNA interference shows that this protein is required for full levels of basal transcription of the KAI1 gene. These results further support the function of Fe65 and APP in gene regulation and show a new role for the SET factor.

Keywords: APP; Tip60; chromatin immunoprecipitation; KAI1; Alzheimer

EMBO reports (2005) 6, 77–82. doi:10.1038/sj.embor.7400309

INTRODUCTION

Fe65 is a multidomain protein having a WW domain in the amino-terminal half and two PTB domains (PTB1 and PTB2) in the carboxyl-terminal half. Numerous results have given support to the possible role of this protein in gene regulation. In fact, it was demonstrated that Fe65 is present in the nucleus (Minopoli *et al*, 2001), where it interacts with the histone acetyl transferase Tip60 (Cao & Sudhof, 2001) and was found to be associated with and to

regulate the expression of the KAI1 gene promoter (Baek *et al*, 2002). Nuclear localization of Fe65 was also confirmed by cell immunostaining, showing the presence of Fe65 in intranuclear speckles (Muresan & Muresan, 2004; Von Rotz *et al*, 2004).

Fe65 interacts with the β -amyloid precursor protein APP (Fiore *et al*, 1995). The latter is a type I membrane protein involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease because it is the precursor of the main constituents of Alzheimer's senile plaques. The β -amyloid peptides are generated from APP through the action of two proteases named β - and γ -secretase (Haass, 2004). The cleavage of APP by secretases generates a peptide, named AICD (APP intracellular domain), which is released from the membrane and is found in the nucleus (Gao & Pimplikar, 2001; Kimberly *et al*, 2001; Von Rotz *et al*, 2004). Intact APP functions as an extranuclear anchor for Fe65, thus preventing Fe65 nuclear translocation (Minopoli *et al*, 2001). The cleavage of APP probably allows Fe65 to reach the nucleus. This regulatory mechanism resembles that controlling the function of other transcription factors, such as those involving N-cadherin cleavage and the CREB-binding protein or Notch (Marambaud *et al*, 2003; Schweisguth, 2004). Recently, a direct involvement of Fe65 in transactivation events through its WW domain has been proposed (Cao & Sudhof, 2004). Here, we show that Fe65 is able to activate transcription depending on a small region of the protein encompassing part of its WW domain. This region binds the nucleosome assembly protein SET, and the activation of transcription mediated by Fe65 is dependent on SET. An oligomeric complex immunoprecipitated by antibodies against Fe65, APP, Tip60 or SET targets the KAI1 gene promoter, and SET is required for the basal transcription of this gene.

RESULTS AND DISCUSSION

The transcription-activating element of Fe65

The ability of the WW domain of Fe65 to activate transcription when fused to the Gal4 DNA-binding domain (Dbd) could be due to the interaction of this domain with certain cofactors. According to this possibility, when a fusion protein, including the Gal4 Dbd and the full-length Fe65 (Gal4–Fe65f.l.; Fig 1A), was

¹CEINGE Biotecnologie Avanzate, Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Via Comunale Margherita 482, 80131 Napoli, Italy

²Howard Hughes Medical Institute, University of California, 9500 Gilman Drive, San Diego, La Jolla, California 92093, USA

³Proteomics and Mass Spectrometry Laboratory, ISPAAM, CNR, Via Argine 1085, 80147 Naples, Italy

+Corresponding author. Tel: +39 081 372 2863; Fax: +39 081 372 2808; E-mail: russot@dbbm.unina.it

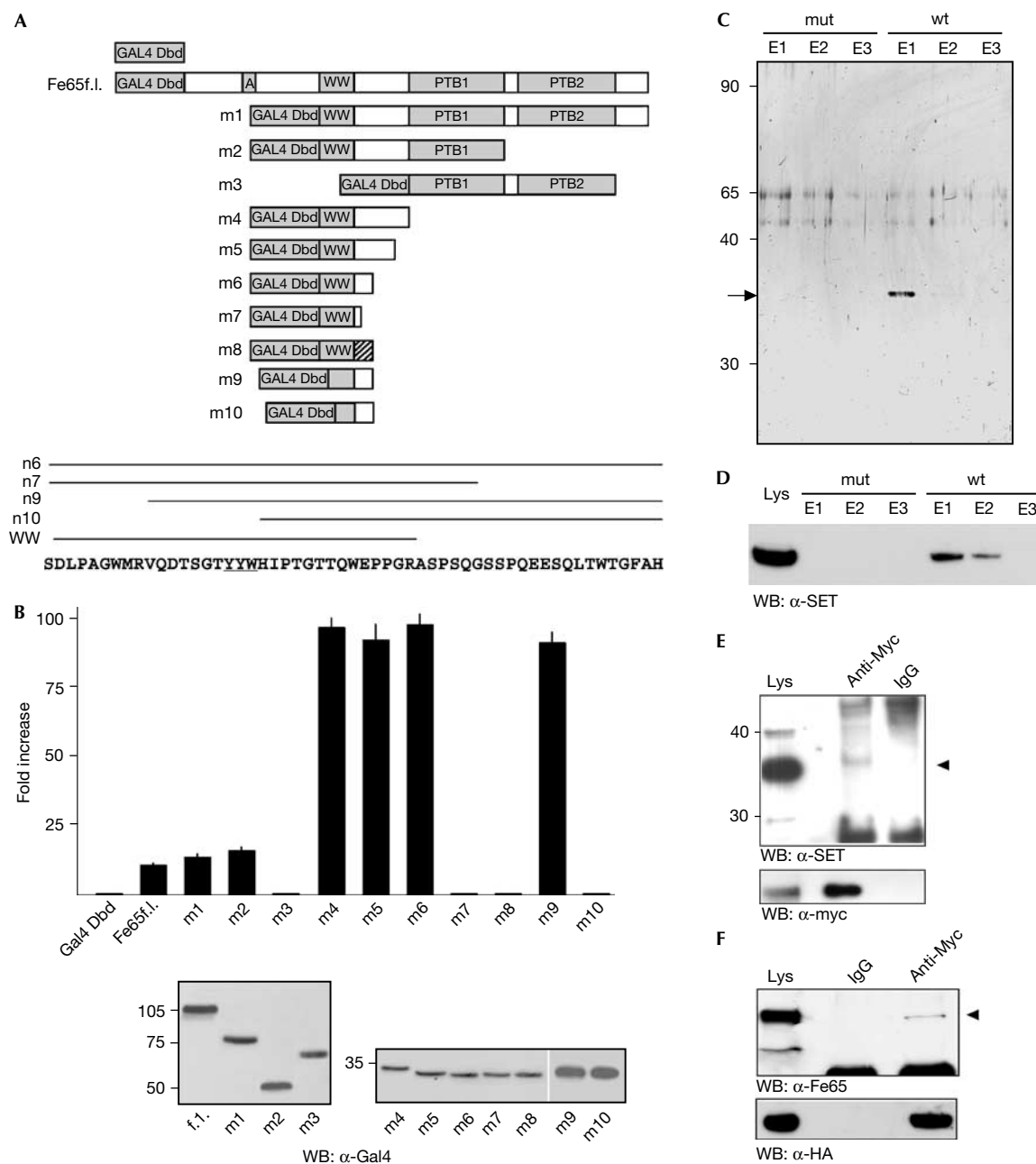


Fig 1 | SET interacts with Fe65. (A) The Gal4 Dbd was cloned upstream of the full-length Fe65 (Fe65f.l.) complementary DNA or various deletion mutants of this cDNA. Striped box in the m8 construct indicates a 19-amino-acid-long region in which the same 19 residues present downstream of the WW domain in the m6 construct are arranged in a scrambled sequence. The Fe65 sequence covered by the crucial constructs m6, m7, m9 and m10 is indicated along with that of the WW domain. (B) The deletion mutants of Fe65 fused to the Gal4 Dbd described in (A) have been co-transfected in HeLa cells with the G5BCAT vector. CAT expression is reported as fold increase compared with that observed in cells transfected with the Gal4 Dbd alone. The values are the mean + s.d. of triplicate experiments. The western blot (WB) of one representative experiment is shown below. (C) Proteins eluted from the mutant (mut) or wild-type (wt) peptide columns (fractions E1–E3) were resolved on 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and the gel was silver stained. The arrow indicates the 35 kDa band, which was identified as SET by mass spectrometry. (D) Proteins eluted from the mutant or wt peptide columns (fractions E1–E3) were resolved on 10% SDS–PAGE and analysed by western blot with α -SET antibody. The lysate of HEK293 cells transfected with SET expression vector was loaded as a control. (E) Proteins from HEK293 cells transfected with Myc-Fe65 were immunoprecipitated with α -Myc monoclonal antibody or with mouse IgGs. Immunoprecipitated proteins were analysed by western blot with SET antibody. (F) Proteins from HEK293 cells transfected with HA-SET were immunoprecipitated with α -HA antibody or with mouse IgGs. The western blot with Fe65 antibody of the immunoprecipitated proteins is shown. (E,F) 50 μ g of the input lysate was loaded in the first lane as a migration control. The arrowheads indicate the bands of SET and Fe65.

co-transfected with the G5BCAT reporter vector and with various constructs encoding fragments of Fe65, we observed that only the region including the WW domain has a marked inhibitory effect (supplementary information online). This suggests that it is titrating an endogenous limiting factor.

To determine the optimal amino-acid sequence for use as bait to purify this factor by affinity chromatography, we dissected the Fe65 region responsible for the activation of transcription when fused to the Gal4 Dbd (Fig 1A). The deletion of both PTB domains of Fe65 results in an increased transactivation efficiency, in agreement with the hypothesis that they have an inhibitory role in the context of the intact molecule (Cao & Sudhof, 2004). On the contrary, the deletion mutants containing the WW domain strongly activate the transcription of the reporter gene (Fig 1B), but the WW domain alone does not act as a transcription activation domain (construct m7). In fact, at least 19 residues at the C-terminus of the WW domain (constructs m4, m5 and m6) are needed to observe a significant CAT gene expression. This 19-residue-long stretch contains some specific sequence information because it cannot be replaced by a scrambled sequence (construct m8).

The m9 protein, lacking the first nine amino acids of the N-terminus of the WW domain, activates transcription to the same extent as the m4 protein, whereas a further deletion of ten amino acids (m10 construct) is completely devoid of activity. These ten residues contain the YYW motif (underlined in Fig 1A) that is necessary for AICD–Fe65-mediated transactivation (Cao & Sudhof, 2001). Thus, it seems that the transcriptional function of Fe65 does not coincide with its WW domain. Accordingly, the minimal region of Fe65 that activates transcription (m9) does not interact with Mena, which on the contrary interacts with the Fe65 WW domain (supplementary information online; Ermekova *et al*, 1997).

The WW overlapping region of Fe65 interacts with SET

Thus, we have decided to use this WW overlapping region (WOR) as bait to affinity-purify the factors mediating Gal4–Fe65-induced transactivation. HEK293 cell extract was first used to challenge a peptide in which the YYW motif, necessary for transactivation, is changed to AAA, and then to challenge a second, wild-type (wt) synthetic peptide. This experimental approach allowed us to purify one protein band eluted from the second chromatography (Fig 1C). Mass spectrometry (MS) analysis of the tryptic digestion of the protein indicated that it is SET, a protein belonging to the family of nucleosome assembly proteins (von Lindern *et al*, 1992). Western blot analysis with an α -SET-specific antibody confirmed identity (Fig 1D).

The existence of an Fe65–SET complex is further confirmed by co-immunoprecipitation experiments. In fact, Myc-tagged Fe65 immunoprecipitates with endogenous SET (Fig 1E) and, conversely, haemagglutinin (HA)-tagged SET immunoprecipitates with endogenous Fe65 (Fig 1F).

The WW domain is a protein–protein interaction module consisting of a triple-stranded antiparallel β -sheet characterized by several conserved residues, including the two Trp that give the name to the domain (Sudol & Hunter, 2000). On the basis of the sequence of the m9 construct, it seems that the minimal module needed to interact with SET only contains the second and third strands of the β -sheet and a stretch of amino acids flanking the third strand at its N-terminus. This minimal structure does not

retain the ability to interact with Mena, suggesting that the WW domain is able to interact with its partners in two ways: one requires the complete three-stranded β -sheet, whereas only two β -strands followed by a C-terminal stretch are necessary for the second type of interaction. This possibility suggests that the WW region is available for the binding of two sets of ligands or that a conformational change of this region could switch the affinity of the domain from one set of ligands to another. This hypothesis could explain the different functions proposed for Fe65, which include cytoskeleton remodelling and cell motility (Sabo *et al*, 2001) and gene regulation.

SET is responsible for Gal4–Fe65-mediated transactivation

To evaluate whether SET is required for transcription activation induced by Gal4–Fe65 fusion proteins, we analysed the effects of SET overexpression or suppression on the transcription activation mediated by Gal4–Fe65 proteins. SET overexpression increases by several-fold the CAT expression induced by Gal4–Fe65f.l. or by the m6 mutant, whereas it has no effect on the activation of transcription induced by the transfection of Gal4 holoprotein (Fig 2A). Furthermore, SET overexpression has no effect on transcription when the cells are transfected with Gal4–Fe65 deletion mutants that are devoid of activity, such as m3, m7, m8 and m10 (Fig 1A), indicating that SET overexpression has no nonspecific effect on transcription (Fig 2A, m10 mutant). Accordingly, these deletion mutants do not immunoprecipitate together with SET (supplementary information online).

Silencing of endogenous SET expression by RNA-mediated interference (RNAi) decreases the levels of SET protein to about 50% of the levels present in the cells transfected with the control double-stranded oligonucleotide (green fluorescent protein (GFP)-targeting short interfering RNA (siRNA)). This is accompanied by a significant decrease of CAT expression in cells transfected with either Gal4–Fe65f.l. or m6 construct (Fig 2B). SET RNAi has no effect on the robust transcription activation driven by the Gal4 holoprotein.

The KAI1 promoter is a target for the Fe65–SET complex

It has been demonstrated that Fe65, together with Tip60 and AICD, can be recruited on transfection to the KAI1 gene promoter (Baek *et al*, 2002). Therefore, we addressed the question of whether a complex containing both Fe65 and SET is similarly associated with the same KAI1 promoter. To this aim, HEK293 cells were transfected with Fe65, SET and/or APP, and Tip60 and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed by using antibodies directed against these proteins. As shown in Fig 3A, when Fe65, SET and APP are co-transfected, a robust protein–DNA complex containing all these proteins was observed even in the absence of Tip60; hence, SET must exert a stabilizing influence similar to that of Tip60. In cells co-transfected with Fe65, SET, APP and Tip60, ChIP showed that all these proteins are present on the KAI1 gene promoter. To examine possible co-recruitment, two-step ChIPs were performed using α -Tip60/ α -SET, α -SET/ α -Tip60, α -APP/ α -Fe65 and α -Fe65/ α -APP antibody combinations. These experiments demonstrated that the four proteins can be present simultaneously on the same promoter. APP overexpression is clearly required to obtain complexes containing Fe65/SET or Fe65/SET/Tip60, supporting the hypothesis that interaction with APP renders Fe65 suitable for binding to other

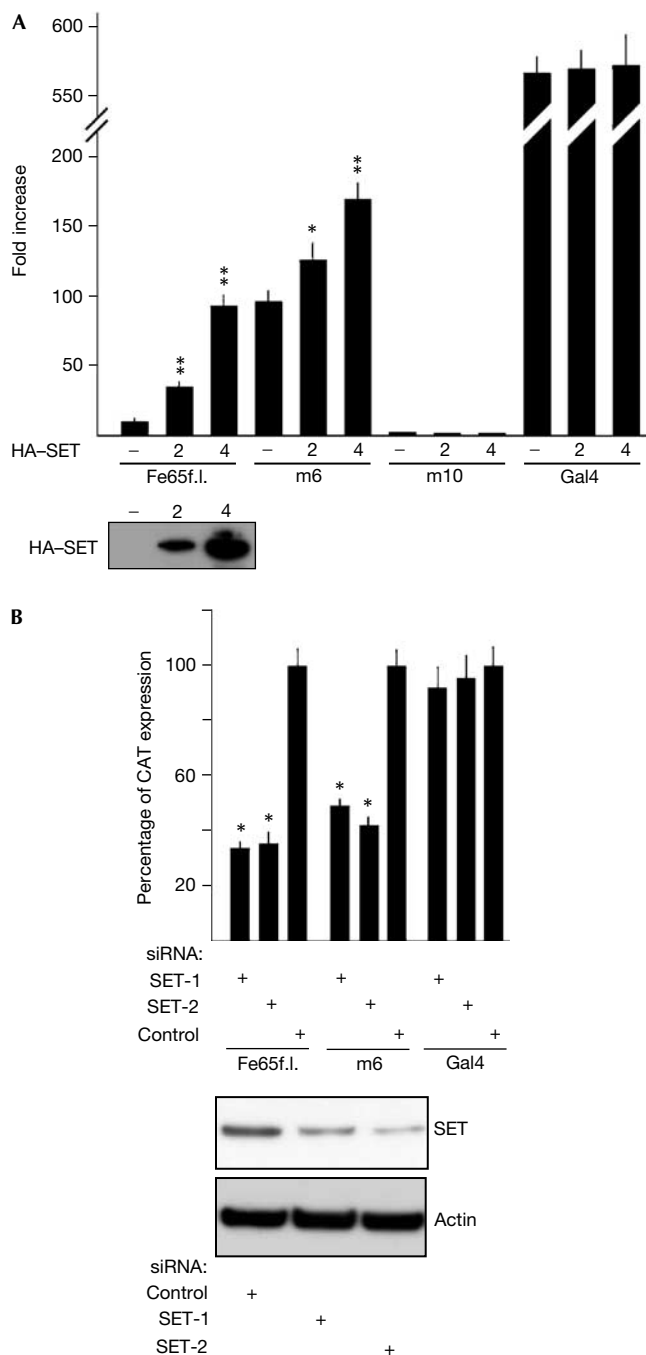


Fig 2 | SET is necessary for Fe65-dependent transcription of a reporter gene. HEK293 cells were transfected with G5BCAT vector and with either Gal4-Fe65f.l., or m6 or m10 constructs (Fig 1A) and with (A) 2 or 4 μ g of a plasmid encoding the HA-SET protein or with (B) siRNA duplexes targeting SET (SET-1 and SET-2) or with control siRNA. The bars in (A) indicate the fold increase of CAT gene transcription compared with that observed in cells transfected with G5BCAT and the Gal4 Dbd alone, and those in (B) indicate the percentage of CAT gene expression measured in cells transfected with GFP-targeting siRNA as a control. SET expression was checked by western blot with α -SET antibody. Standard deviations were calculated on quadruplicate experiments (probability associated with Student's *t*-test: * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$).

ligands (Cao & Sudhof, 2004). α -APP antibodies directed against C-terminal epitopes of the protein immunoprecipitate chromatin complexes; by contrast, we failed to obtain any CHIP using antibodies directed against the extracellular-intraluminal domain of APP (data not shown), suggesting that only the C-terminal domain of the protein is present in the complex.

The KAI1 gene is under the control of homodimeric p50-p50 NF- κ B. Interleukin-1 β induces exchange of the N-CoR/TAB2/HDAC3 co-repressor complex with a Tip60-containing coactivator complex (Baek *et al*, 2002). The same promoter is also activated by a complex containing Tip60, Fe65 and AICD. HAT activity of Tip60 might be required for the observed transcription activation, but in some cases Tip60 may not be required. In fact, Gal4-Fe65 fusion proteins lacking the PTB1 domain, the highest affinity binding site for Tip60, are potent transcription activators (Cao & Sudhof, 2004; Fig 1B). Furthermore, PTB1 domain overexpression did not titrate any limiting factor necessary for Gal4-Fe65-dependent transactivation (supplementary information online), and Tip60 overexpression did not affect Gal4-Fe65 activity (supplementary information online). Conversely, SET is required for Gal4-Fe65-dependent transactivation, as shown by its overexpression or suppression by RNAi. Therefore, we addressed the possible role of SET in the regulation of transcription of the KAI1 gene. To this aim, we measured the level of KAI1 mRNA in cells transfected with siRNAs targeting SET mRNA. As shown in Fig 3B, the suppression of SET expression significantly decreases KAI1 mRNA levels, demonstrating that, under basal conditions, SET is quantitatively important for KAI1 gene transcription.

Although the role of SET-containing complexes in caspase-independent apoptosis has been recently shown (Fan *et al*, 2003), its involvement in the regulation of gene transcription is still unclear. There are several results indicating that SET might have additional activities and functions, as it interacts with p300/CBP histone acetyltransferase. The consequences of this interaction could be either an increase (Shikama *et al*, 2000) or inhibition (Seo *et al*, 2001) of the transcription of p300/CBP target genes. The results reported in this paper suggest that Fe65 is the adaptor molecule that assembles SET and Tip60 on chromatin, possibly leading to the regulation of transcription. We have also demonstrated that APP is necessary for formation of the complex and that the C-terminal tail of APP is part of the chromatin complex. The possible role of secretase-driven APP cleavage in the regulation of the observed phenomena is of significant interest, as altered APP processing could result in a change of gene expression. A link between SET functions and presenilin-dependent secretase activity is suggested by the observation that Spr-2, one of the suppressors of Sel-12 presenilin defects in *Caenorhabditis elegans*, is the nematode orthologue of SET (Wen *et al*, 2000). This relationship should be explored further.

METHODS

Recombinant constructs and proteins. Vectors for Gal4 Dbd-Fe65 fusions were generated by cloning the appropriate Fe65 cDNA fragments, amplified by PCR, in-frame with the Gal4 Dbd in the pRcCMV plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The sequences of PCR primers are available on request. Full-length human SET cDNA was obtained by reverse transcription-PCR using total RNA from HEK293 cells. HA-tagged SET was generated

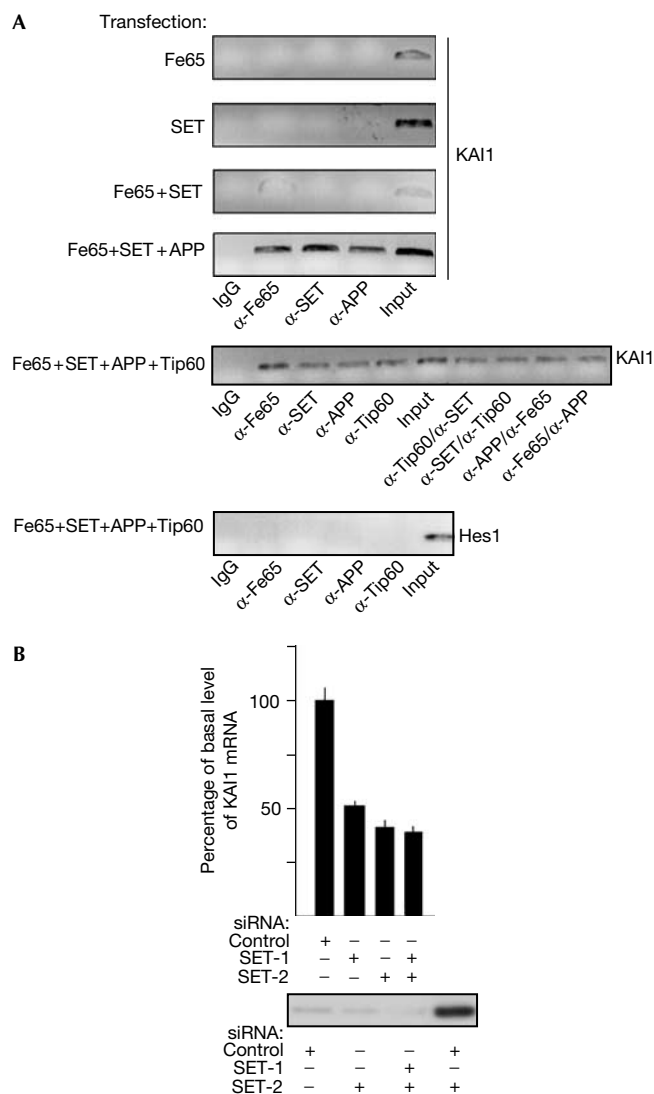


Fig 3 | The Fe65–SET–APP complex is bound to the KAI1 promoter and SET is necessary for KAI1 gene expression. (A) ChIP assay on KAI1 promoter in HEK293 cells transfected as indicated. The antibodies used for single ChIP and the order of those used for double ChIP is reported below the experiments. 10% of the input DNA was amplified as a control. Hes1 gene ChIP is reported as a control. (B) HEK293 cells were transfected with the indicated control or SET siRNAs, and total RNA was analysed by real-time PCR to measure KAI1 mRNA. The histogram reports the mean + s.d. of triplicate experiments.

by using a reverse primer containing the HA-coding epitope sequence at the 3' end, in the pRcCMV vector.

Cell cultures, transfections and co-precipitations. HeLa and HEK293 cells were grown at 37 °C in the presence of 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (HyClone, Logan, UT, USA). HeLa cells were transfected by calcium phosphate with 3 μ g G5BCAT vector and with 3 μ g of the plasmids expressing the fusion proteins. CAT

expression was measured by using colorimetric CAT enzyme-linked immunoadsorbent assay (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). HEK293 cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 100 mm dishes. SET double-stranded 21-mer RNAs and control double-stranded RNA targeting GFP (Fan *et al*, 2003) were synthesized by Qiagen, and transfected in HEK293 with Lipofectamine 2000. Protein extracts were prepared as described (Gianni *et al*, 2003). For immunoprecipitations, 5 μ l of antibodies was incubated with 1.5 mg of protein lysates for 2 h at 4 °C, followed by a 1 h incubation with Protein A–Sepharose. Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer. Proteins released by boiling in SDS sample buffer were separated by Novex Bis–Tris 4–12% polyacrylamide gels (Invitrogen) and analysed by using SET (1:1,000) or Fe65 (1:2,000) antibodies.

Purification of WOR ligands. The peptides used for affinity purification were synthesized by Tufts University Core Facility (Boston, MA, USA). Both peptides carry the Strep-Tag sequence at their C-termini: wild-type peptide, WSHYPQFEKGGVQDTSQTYYWHIPTGTTQWEPPGRASPSQGNSPQESQLTWTGFAH; mutant peptide, the underlined sequence is changed to AAA. Peptides (100 nmol) was dissolved in 1 ml of 100 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl and 1 mM EDTA and applied on columns containing 1 ml of Strep-Tactin matrix (IBA, Göttingen, Germany; Skerra & Schmidt, 2000). Affinity chromatography was performed with HEK293 lysates in 100 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 1 mM sodium vanadate and protease inhibitors. The lysate was precleared on a column containing Strep-Tactin matrix, then on the mutant peptide column. The flow-through was then applied on wild-type peptide column. Proteins were eluted with 50 mM ammonium bicarbonate + 2.5 mM desthiobiotin and run on 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Bands were excised from the gel, digested with trypsin and the peptide mixtures were analysed by MALDI-TOF mass spectrometry as previously reported (Gianni *et al*, 2003).

Real-time PCR. Total RNA was prepared from HEK293 cells by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and subjected to cDNA synthesis with random hexanucleotide primers and MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 48 °C for 1 h. The cDNA (1 μ l) was then amplified for 40 cycles using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) and template-specific primers in an ABI Prism 7900 system (Applied Biosystems). Relative quantification of gene expression was performed using the comparative threshold (C_T) method. Changes in mRNA expression levels were calculated following normalization to β -actin or c-Abl transcripts. The ratios obtained following normalization are expressed as fold change over calibrator samples. The primer sequences are as follows: KAI1, 5'-AGGATGCCTGGGACTACGTG and 5'-GCTCAGCGTTGCTCTGCCAGT; β -actin, 5'-TCGTGCGTGACATTAGGAG and 5'-GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT; c-Abl, 5'-GGTATGAAGGAGGGTGACCA and 5'-GTGAACAACTCAGCCAGAGTGTGA. **ChIP.** ChIP assays were performed as described (Shang & Brown, 2002). Subconfluent HEK293 cells (100-mm dishes) were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at 20 °C and then quickly rinsed with ice-cold PBS. Diluted chromatin solution was precleared in 45 μ l slurry 50% Protein A–Sepharose (Sigma, St Louis, MO, USA) and 2 μ g of sheared salmon sperm DNA (Invitrogen) for 2 h at 4 °C.

The supernatants were immunoprecipitated overnight with 2 µg of the following antibodies: α-Fe65 (I-12), α-APP (CT695, Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA), α-SET (Abcam, Cambridge, MA, USA) and α-Tip60 (Upstate Biotechnology). The antibodies recognizing the extracellular/intraluminal domain of APP were 6E10/4G8 (Abcam). A 2 µg portion of rabbit or goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) was used as a control.

Protein-bound immunoprecipitated DNA was reverse cross-linked at 65 °C overnight and then purified by using a PCR purification kit (Qiagen). A 2 µl portion of DNA solution was used for PCR amplification (30 cycles). Primer sequences were as follows: KAI1, 5'-GACAGGGTTTCATCCTGTTGC and 5'-GAGGATAGCCTGGCCCTAGC; Hes1, 5'-CTCAGGCGCGCCATTGGCC and 5'-GCTTACGTCCTTTACTTGACTTTC. PCR products were run on a 1.0% agarose gel and analysed by ethidium bromide staining. For two-step ChIPs, the immunocomplexes were eluted by adding 100 µl of MCP beads (Pierce, New York, NY, USA) to the pelleted Sepharose beads and by shaking for 1 h at 20 °C. The supernatants were collected and diluted tenfold in 1 ml final volume with dilution buffer. A 2 µg portion of second antibody was added and the immunoprecipitations were performed again as described above.

Supplementary information is available at *EMBO reports* online (<http://www.emboreports.org>).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the VI Framework Programme of the European Commission (LSHM-CT-2003-503330), FIRB 'Proneuro' and the Alzheimer Association.

REFERENCES

Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-κB and β-amyloid precursor protein. *Cell* **110**: 55–67

Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293**: 115–120

Cao X, Sudhof TC (2004) Dissection of amyloid-β precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* **279**: 24601–24611

Ermekova KS, Zambrano N, Linn H, Minopoli G, Gertler F, Russo T, Sudol M (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J Biol Chem* **272**: 32869–32877

Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* **112**: 659–672

Fiore F, Zambrano N, Minopoli G, Donini V, Duilio A, Russo T (1995) The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine

interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **270**: 30853–30856

Gao Y, Pimplikar SW (2001) The γ-secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14979–14984

Gianni D et al (2003) Platelet-derived growth factor induces the β-γ-secretase-mediated cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein through a Src-Rac-dependent pathway. *J Biol Chem* **278**: 9290–9297

Haass C (2004) Take five-BACE and the γ-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β-peptide generation. *EMBO J* **23**: 483–488

Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ (2001) The intracellular domain of the β-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* **276**: 40288–40292

Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114**: 635–645

Minopoli G, de Candia P, Bonetti A, Faraonio R, Zambrano N, Russo T (2001) The β-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J Biol Chem* **276**: 6545–6550

Muresan Z, Muresan V (2004) A phosphorylated, carboxy-terminal fragment of β-amyloid precursor protein localizes to the splicing factor compartment. *Hum Mol Genet* **13**: 475–488

Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* **153**: 1403–1414

Schweisguth F (2004) Notch signaling activity. *Curr Biol* **14**: 129–138

Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D (2001) Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* **104**: 119–130

Shang Y, Brown M (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* **295**: 2465–2468

Shikama N et al (2000) Functional interaction between nucleosome assembly proteins and p300/CREB-binding protein family coactivators. *Mol Cell Biol* **20**: 8933–8943

Skerra A, Schmidt TGM (2000) Use of the *Strep*-tag and streptavidin for recombinant protein purification and detection. *Methods Enzymol* **326**: 271–304

Sudol M, Hunter T (2000) NeW wrinkles for an old domain. *Cell* **103**: 1001–1004

Von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, Raap A, Hagemeyer A, Grosveld G (1992) Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* **12**: 3346–3355

Von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* **117**: 4435–4448

Wen C, Levitan D, Li X, Greenwald I (2000) Spr-2, a suppressor of the egg-laying defect caused by loss of Sel-12 presenilin in *Caenorhabditis elegans*, is a member of the SET protein subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14524–14529

Platelet-derived Growth Factor Induces the β - γ -Secretase-mediated Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein through a Src-Rac-dependent Pathway*

Received for publication, November 21, 2002, and in revised form, December 23, 2002
Published, JBC Papers in Press, January 6, 2003, DOI 10.1074/jbc.M211899200

Davide Gianni^{‡§}, Nicola Zambrano^{‡§}, Marida Bimonte[‡], Giuseppina Minopoli^{‡¶}, Luc Mercken^{||},
Fabio Talamo^{**}, Andrea Scaloni^{**}, and Tommaso Russo^{‡§§}

From the [‡]Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli 80131, Italy, ^{‡§}CEINGE biotecnologie avanzate, Napoli 80131, Italy ^{||}Neurodegenerative Disease Group, Aventis Pharma, Vitry-sur-Seine 94400, France, and the ^{**}Proteomics and Mass Spectrometry Laboratory, ISPAAM, National Research Council, Napoli 80147, Italy

The β -amyloid peptide ($A\beta$) present in the senile plaques of Alzheimer's disease derives from the cleavage of a membrane protein, named APP, driven by two enzymes, known as β - and γ -secretases. The mechanisms regulating this cleavage are not understood. We have developed an experimental system to identify possible extracellular signals able to trigger the cleavage of an APP-Gal4 fusion protein, which is detected by measuring the expression of the CAT gene transcribed under the control of the Gal4 transcription factor, which is released from the membrane upon the cleavage of APP-Gal4. By using this assay, we purified a protein contained in the C6 cell-conditioned medium, which activates the cleavage of APP-Gal4 and which we demonstrated to be PDGF-BB. The APP-Gal4 processing induced by PDGF is dependent on the γ -secretase activity, being abolished by an inhibitor of this enzyme, and is the consequence of the activation of a pathway downstream of the PDGF-receptor, which includes the non-receptor tyrosine kinase Src and the small G-protein Rac1. These findings are confirmed by the observation that a constitutively active form of Src increases $A\beta$ generation and that, in cells stably expressing APP, the generation of $A\beta$ is strongly decreased by the Src tyrosine kinase inhibitor PP2.

consists of ~4-kDa peptides derived from the proteolytic processing of a membrane protein named amyloid precursor protein (APP). This amyloidogenic processing is driven by two enzyme activities, β -site APP cleaving enzyme (BACE) and γ -secretase. BACE cleaves APP at 28 residues from the boundary between the extracellular/intraluminal domain of APP and the transmembrane domain of the protein (for a review see Ref. 1), releasing a large soluble protein, including nearly all the extracellular/intraluminal part of APP, and a short transmembrane peptide, including the 99 C-terminal residues of APP. This transmembrane C99 stub is a substrate for the γ -secretase activity, which cleaves it, in a presenilin-dependent fashion, within the membrane α -helix, giving rise to the $A\beta$ peptide 40–42 amino acids long and to a peptide named APP intracellular domain (AID), which includes the small C-terminal cytosolic domain of APP (for a review see Refs. 2 and 3).

The functions of APP and its proteolytic processing are still unknown. However, although the functions of the APP ectodomain remain elusive, there is increasing evidence that its cytodomain is the center of a complex network of interactions with several proteins, involved in vesicle transport and in signal transduction. In fact, it was demonstrated that APP cytoplasmic domain interacts with kinesin light chain and contributes to vesicles transport (4), thus suggesting that APP cleavage could regulate the transport of vesicles in the axons. On the other hand, the APP cytodomain binds several PTB domain-containing proteins, some of which are involved as adaptor proteins in signal transduction. Fe65 is the first protein that was found to form a stable complex with the cytosolic domain of APP, through one of the two PTB domains it possesses (5, 6). Fe65 is an adaptor protein that interacts with APP, Mena (7) (the mammalian orthologue of the product of the *enabled* gene of *Drosophila*), tyrosine kinase Abl (8) (through its WW domain), transcription factor LSF (9), the histone acetyltransferase Tip60 (10), and low density lipoprotein-receptor-related protein LRP (11) (through its second PTB domain). The involvement of Mena and Abl in the complexes, including APP and Fe65, is in agreement with the finding that APP cytodomain also interacts with mDab1 (12), the orthologue of the *Drosophila disabled* gene, and with the Abl TK, through its SH2 domain (8), given that genetic manipulation of the fly indicated that *enabled*, *disabled*, and *Dabl* are associated in the same pathway (13). Another interactor of APP is X11 (14), an adaptor protein that forms complexes with various proteins, including Munc18 and CASK (15). More recently, two adaptors involved in signal transduction, Shc and Jip1, have been demon-

β -Amyloid ($A\beta$)¹ deposition in the so-called amyloid plaques is one of the main features of Alzheimer's pathology. β -Amyloid

* This work was supported in part by grants from the V Framework program (contract QLK6-1999-02238) EU, from the Italian Ministry of Health (Progetto Alzheimer), Miur-FIRB RBNE0IWIY7B, from Biogem-Italy (to T. R.), and from MIUR-PRIN (to N. Z.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Both authors contributed equally to this work.

¶ Recipient of a Biogem fellowship.

§§ To whom correspondence should be addressed: Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, via S. Pansini 5, Napoli 80131, Italy. Tel.: 39-08-17-46-3131; Fax: 39-08-17-46-4359; E-mail: russot@dbbm.unina.it.

¹ The abbreviations used are: $A\beta$, beta-amyloid peptide; AID, APP intracellular domain; APP, amyloid precursor protein; AS, ammonium sulfate; BACE, β -site APP cleaving enzyme; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; PTB, phosphotyrosine binding domain; TK, tyrosine kinase; PDGF, platelet-derived growth factor; PDGF-R, PDGF receptor; CMV, cytomegalovirus; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; CHO, Chinese hamster ovary; PBS, phosphate-buffered saline; FPLC, fast-protein liquid chromatography; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; AD, Alzheimer's disease; PDGF-B, PDGF B subunit; PDGF-BB, PDGF-B dimer; PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine; PP3, 4-amino-7-phenylpyrazolo(3,4-d)pyrimidine; sAPP, soluble APP.

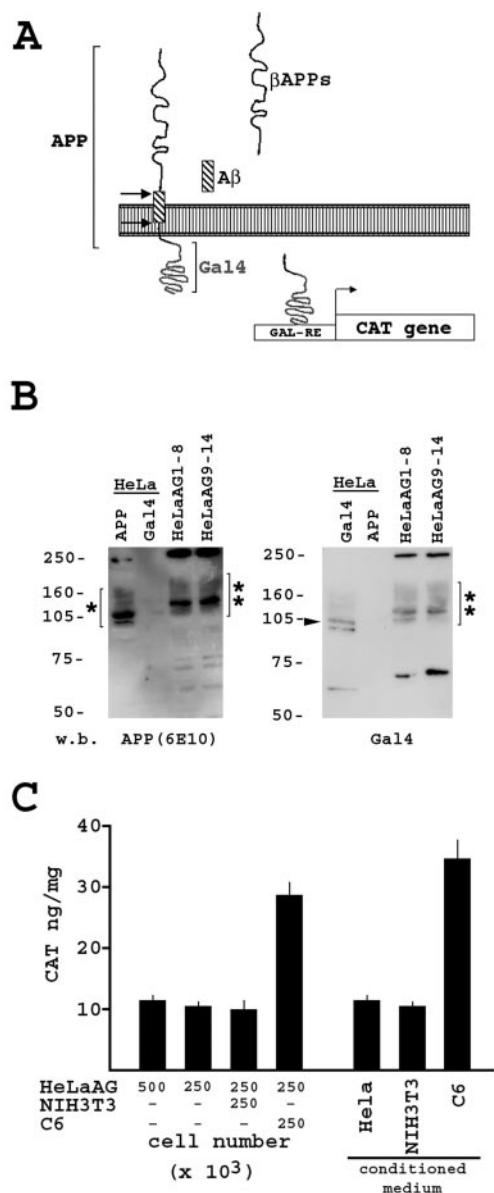


FIG. 1. Isolation and characterization of HeLa cell clones stably expressing APP-Gal4 fusion protein. *A*, schematic representation of the experimental system: APP-Gal4 fusion protein is cleaved by β - and γ -secretases, and this results in the release from the membrane of Gal4 protein fused to the intracellular domain of APP (AID-Gal4). This protein then activates the transcription of the CAT gene cloned under the control of five Gal4 cis-elements. *B*, Western blot analyses of lysates from HeLa cells transfected with human APP₆₉₅ or with Gal4 expression vectors and from two pools of HeLa clones (HeLaAG1-8, HeLaAG9-14) stably expressing APP-Gal4 fusion protein. The two Western blots are with APP 6E10 antibody, recognizing the extracellular domain of APP, and with Gal4 antibody, respectively. *One asterisk* indicates wild type APP bands, *two asterisks* indicate APP-Gal4 bands, and the *arrowhead* indicates wild type Gal4 bands. *C*, HeLaAG cells transfected with G5BCAT vector were co-cultured with either NIH3T3 or C6 cells or cultured in the presence of the conditioned medium of these cell lines. For co-cultures, cells were plated at the indicated cell numbers, harvested 72 h after plating and their extracts were assayed for CAT concentration. Conditioned media from 72 h cultures of the indicated cells were added to 2.5×10^5 HeLaAG cells. Extracts from cells harvested 48 h after the exposure to conditioned medium were assayed for CAT concentration. Standard deviations of triplicate experiments are reported.

G5BCAT vector (21) (see Fig. 1A). Based on this experimental design, HeLa cells were transfected with a vector driving the expression of APP-Gal4 fusion protein and G418 resistance gene, and several clones stably expressing APP-Gal4 have been

isolated. Fig. 1B shows a Western blot of the extracts from several HeLa clones challenged with either APP or Gal4 antibodies and demonstrates the expression of a protein recognized by both antibodies. The experiments reported below were conducted by using two pools of these clones, HeLaAG1-8 and HeLaAG9-14, thereafter indicated as HeLaAG.

To evaluate both cell-anchored and secreted factors that could activate APP-Gal4 proteolytic processing, the first experimental approach we used consisted of 1) a co-culture of HeLaAG cells, transiently transfected with G5BCAT plasmid, with various cell lines of different origin and 2) an assay of CAT accumulation in HeLaAG cultures pure or co-cultured with these cells. Fig. 1C shows that co-culturing of HeLaAG with C6 cells resulted in a significant increase of the CAT expressed by HeLaAG, whereas no change was observed in the co-cultures with other cell lines, such as NIH3T3 fibroblasts. C6 cells are derived from a rat glioma and are known to secrete several growth factors (24). Therefore, we examined whether the conditioned medium from C6 cells mimics the effect of CAT accumulation observed in the co-cultures. As shown in Fig. 1C, HeLaAG cells, grown in the presence of C6-conditioned medium, express higher levels of CAT compared with the cells grown in the conditioned medium from HeLa cells or from NIH3T3 cultures.

Purification of the APP-Gal4 Cleavage-inducing Activity—A large-scale preparation of C6-conditioned medium was used as a source for the purification of the one or more molecules that induce the CAT accumulation in HeLaAG cells transfected with G5BCAT vector. Fig. 2 shows the steps of this purification based on ammonium sulfate (AS) precipitation, size-exclusion chromatography, and SDS-PAGE. The activity is restricted to the 40% AS fraction (Fig. 2A), which was applied on FPLC equipped with a Sephadex G-75. Eluted fractions from the chromatography were assayed for their ability to induce CAT accumulation in HeLaAG cells, and the results allowed us to identify two peaks of activity of about 70 and 30 kDa, respectively (Fig. 2B). SDS-PAGE of the proteins present in the relevant fractions, compared with fractions devoid of activity, suggested that one band of about 15 kDa could be a good candidate (see Fig. 2C). This band, separately excised from the lanes of the corresponding active fractions, was digested with trypsin and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Peptide mass fingerprint analysis and non-redundant sequence data base matching in both cases allowed its unambiguous identification as PDGF-B. To confirm the identification, the relevant fractions were electrophoresed and blotted with a PDGF antibody. This blot demonstrated that PDGF is present only in the fractions that activate the accumulation of CAT in HeLaAG cells (Fig. 2D).

PDGF Induces a γ -Secretase-dependent Cleavage of APP-Gal4 Protein—HeLaAG were exposed to 40 ng/ml of purified human PDGF-BB for 12 h, and this resulted in a dramatic induction of CAT expression (Fig. 3). This phenomenon depends on the activation of the PDGF receptor (PDGF-R), considering that the treatment of HeLaAG cells with a TK-nonspecific inhibitor such as genistein or with PDGF-R inhibitor AG1296 resulted in a significant decrease of CAT accumulation, following the treatment with PDGF. Although, unexpectedly, PDGF is present also in the ~70-kDa fraction of the size exclusion chromatography (see Fig. 2, C and D), it cannot be excluded that other molecules with an activity similar to that of PDGF could be also present in the C6-conditioned medium. To address this point, HeLaAG cells were treated with the 40% ammonium sulfate fraction and with the PDGF-R inhibitor. Also in this case, the accumulation of CAT was prevented by the PDGF-R inhibitor (see Fig. 3), thus strongly supporting that PDGF is the only fac-

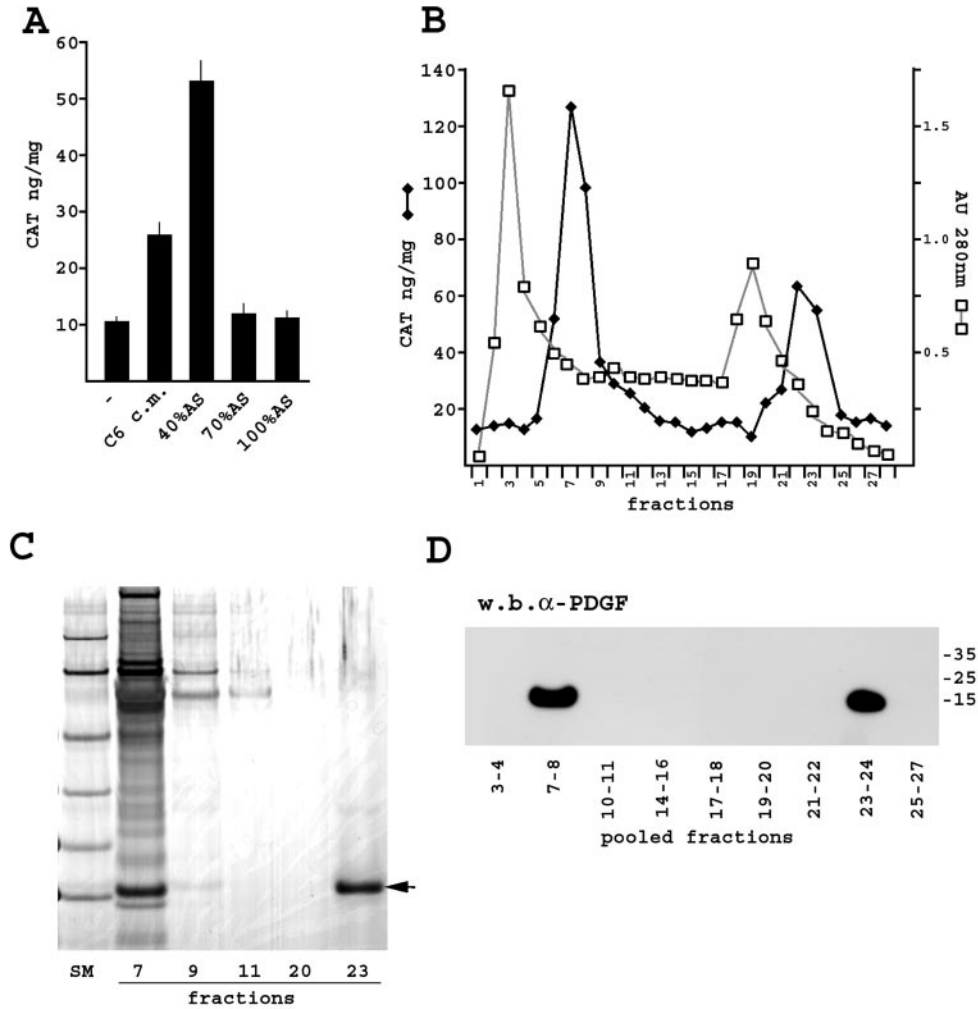


FIG. 2. Purification of the activity present in the C6-conditioned medium, which induces CAT expression in HeLaAG cells. A, 3 liters of C6-conditioned medium was concentrated and fractionated by ammonium sulfate precipitation. The fractions obtained with a salt saturation of 40, 70, or 100% were dialyzed and assayed for their ability to induce CAT accumulation in HeLaAG cells transfected with G5BCAT vector. The concentrations of assayed samples were: 40% AS, 5 μ g/ml; 70% AS, 200 μ g/ml; 100% AS, 200 μ g/ml. Standard deviations of triplicate experiments are reported. B, 40% AS fraction was applied on a Sephadex G-75 column and chromatographed by FPLC. Fractions of 400 μ l were collected and assayed for their ability to induce CAT accumulation in HeLaAG cells. The calibration of the column with pure standards of known molecular mass indicated that the two peaks of activity were eluted as \sim 70 and 30 kDa proteins, respectively. C, fractions of the Sephadex chromatography containing (7 and 23) and not containing (9, 11, and 20) the activity were concentrated and electrophoresed on a reducing SDS-PAGE and silver-stained. The arrow indicates a band of about 15 kDa present in fractions containing the activity. D, pooled fractions containing (7–8 and 23–24) or not containing (3–4, 10–11, 14–16, 17–18, 19–20, 21–22, 25–27) the activity were electrophoresed on a reducing SDS-PAGE and blotted with a PDGF antibody, thus confirming the identification made by MALDI-TOF mass spectrometry.

tor, present in C6-conditioned medium, that activates APP-Gal4 cleavage. Furthermore, immunodepletion of the 40% AS fraction with anti-PDGF antibody resulted in the abolishment of the CAT accumulation observed upon exposure of HeLaAG cells to pure 40% AS fraction, whereas the depletion with mouse IgG was completely ineffective (see Fig. 3). Therefore, the activity present in the 70-kDa fraction could be a multimer of the PDGF-B subunit.

To rule out the possibility that PDGF treatment induces CAT accumulation through a mechanism independent from the cleavage of APP-Gal4, we exposed wild type HeLa cells mock transfected or transfected with Gal4 to 40 ng/ml PDGF-BB. As shown in Fig. 4A, PDGF-BB treatment did not modify the accumulation of CAT in these experimental conditions. Therefore, the increase of CAT concentration observed in HeLaAG cells exposed to PDGF could be due to an activation of the CAT gene transcription by GAL4 released upon the cleavage of APP-Gal4. To address this point, extracts from HeLaAG cells exposed to PDGF or AS 40% fraction were analyzed by Western

blot with anti-APP or anti-Gal4 antibodies. These experiments showed the presence, in extracts from HeLaAG cells exposed to PDGF or 40% AS fraction, of a band of a size very similar to that of Gal4, with both the Gal4 antibody and the CT695 antibody, recognizing the APP C-terminal domain (see Fig. 4B). A similar blot was challenged with the 6E10 antibody, which was directed against the N-terminal sequence of the β -amyloid peptide. This antibody recognizes the uncleaved APP-Gal4 but not the cleaved molecule. This indicates that the cleaved molecule contains the C-terminal domain of APP (AID-Gal4) and not the N-terminal sequence of A β .

To evaluate whether the observed cleavage of APP-Gal4 requires the γ -secretase activity, we treated HeLaAG cells exposed to PDGF or to the 40% AS fraction with the γ -secretase inhibitor compound X (25). As shown in Fig. 4C, the treatment of HeLaAG cells exposed to either PDGF or partially purified fraction with 10 μ M of the γ -secretase inhibitor resulted in an almost complete abolishment of the effects on CAT accumulation. These results indicate that PDGF, through the activation

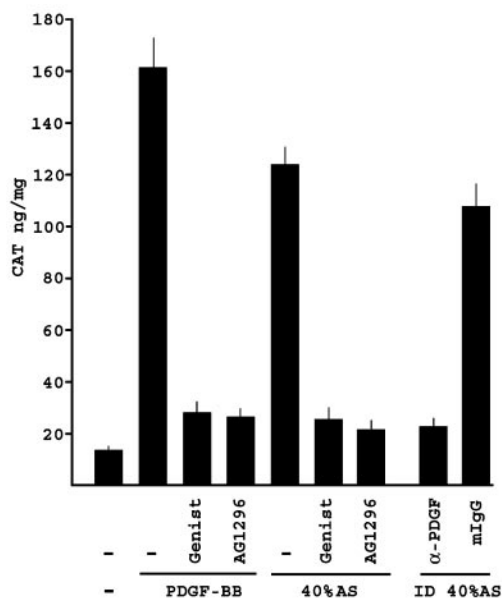


FIG. 3. PDGF-BB contained in C6 cell-conditioned medium induces CAT accumulation in HeLaAG cells. HeLaAG cells transfected with G5BCAT vector were exposed to 40 ng/ml recombinant PDGF-BB or to 10 μ g/ml 40% AS fraction for 24 h before harvesting. In the same conditions the cells were also exposed, as indicated, to 30 μ M genistein or to 2 μ M AG1296, which are a general TK inhibitor and a PDGF-R TK inhibitor, respectively. To ascertain whether the 40% AS fraction also contains factors, other than PDGF-BB, activating CAT expression, the 40% AS fraction was immunodepleted either with anti-PDGF antibody (α -PDGF) or with mouse IgG (mIgG), and HeLaAG cells were exposed to these mixtures (ID 40%AS). Standard deviations of triplicate experiments are reported.

of its receptor, induces a proteolytic cleavage of APP-Gal4, which requires the γ -secretase activity.

PDGF-induced APP-Gal4 Cleavage Functions through an Src-dependent Pathway—There are many pathways activated following PDGF-R interaction with its cognate growth factor. Tyrosine-phosphorylated PDGF-R activates the Ras-MAPK pathway through Grb2/SOS and Shc/Grb2/SOS. The possible involvement of this pathway in the APP-Gal4 processing was explored by treating HeLaAG cells exposed to PDGF with the inhibitor of ERKs, PD098059; this inhibitor does not modify the effects of both PDGF and 40% AS fraction (Fig. 5). Another pathway that mediates the effects of PDGF-R activation is that of PI3K-Akt. Also, Fig. 5 shows that the PI3K inhibitor wortmannin does not affect the CAT accumulation induced by both PDGF and 40% AS fraction.

Src and other members of the Src non-receptor TK family interact with and are activated by PDGF-R (26). To explore this pathway, HeLaAG cells have been treated with a specific inhibitor of Src TK, PP2, and with a related compound unable to inhibit Src (PP3). The treatment with PP2 of HeLaAG cells almost completely abolished the accumulation of CAT observed upon the exposure to either PDGF or 40% ammonium sulfate fraction, whereas the treatment with PP3 was completely ineffective (see Fig. 5).

To further explore this finding, HeLaAG cells were transiently transfected with SrcYF vector expressing a constitutively active Src mutant (27). As shown in Fig. 6A, the expression of active Src resulted in the accumulation of CAT in the absence of stimulation by either PDGF or purified fractions. Accordingly, HeLaAG cells transfected with a dominant negative mutant of Src (SrcY-FKM) (28) and exposed to PDGF or to 40% AS fraction showed a significantly decreased accumulation of CAT, compared with mock transfected cells exposed to PDGF.

The possible effectors downstream of Src are not completely

understood. One of these downstream factors is the non-receptor TK Abl (29). The possible role of Abl TK in APP-Gal4 cleavage was explored by transfecting HeLaAG cells with a constitutively active mutant of Abl (Abl-PP) (30). Under these conditions no induction of APP-Gal4 cleavage was observed, thus indicating that this kinase is not involved in this phenomenon. On the contrary, another molecule that has been recently observed to be activated by PDGF and Src is Rac1, which belongs to the family of Rho G-proteins. The transfection of HeLaAG cells with a vector driving the expression of a constitutively active form of Rac (RacQL) (31) resulted in an increase of CAT comparable to that observed upon the transfection with SrcYF, and the co-transfection of SrcYF with a dominant negative mutant of Rac (RacN17) strongly decreased the amount of CAT compared with that accumulated in the cells transfected only with SrcYF (see Fig. 6A). Furthermore, a similar inhibition of CAT accumulation, following the exposure to either PDGF or 40% ammonium sulfate fraction, was observed in the cells transfected with RacN17.

To ascertain whether Src and Rac1, like PDGF, also activate APP-Gal4 processing through a γ -secretase-dependent pathway, HeLaAG cells were transfected with SrcYF or with RacQL, the constitutively active mutants of these two proteins, and treated with the γ -secretase inhibitor compound X. As shown in Fig. 6B, the γ -secretase inhibitor almost completely abolished the effects of SrcYF and RacQL transfections.

PDGF Induces the Generation of $A\beta$ from Wild Type APP through an Src-dependent Pathway—The above reported results indicate a clear dependence of the PDGF-Src-induced cleavage of APP upon the γ -secretase activity, but they don't allow us to distinguish between α -secretase and BACE activities, whose actions are known to precede the γ -secretase-induced cleavage. To address this point, we examined the effects of the PDGF-Src pathway on the processing of APP, by measuring the accumulation of $A\beta$ in cultured cells, in which this pathway is activated or blocked. To do this, HEK293 cells were transfected with APP₆₉₅ alone or with APP₆₉₅ plus SrcYF. As shown in Fig. 7A, there is a significantly increased accumulation of $A\beta$ in the medium of cells expressing the constitutively active form of Src. Furthermore, CHO cells stably expressing APP₆₉₅, which generate high levels of $A\beta$, were treated with two concentrations of the inhibitor of Src TK, PP2. In these conditions, $A\beta$ generation is significantly decreased, whereas the analogous molecule PP3, not affecting Src TK activity, was completely ineffective (see Fig. 7B).

DISCUSSION

The proteolytic processing of APP leading to the generation of $A\beta$ peptide is an extensively studied phenomenon, due to its implication in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). The great effort to understand the machineries involved in the various types of cleavages of APP resulted in the identification and in the molecular characterization of two out three of the secretases, *i.e.* α - and β -secretases, and many preliminary results indicate that, despite its complexity, also γ -secretase is near to be understood. On the contrary, the mechanisms regulating this proteolytic processing are not completely understood. Here, we report experiments demonstrating that the β - γ processing of APP is under a positive control by PDGF through a pathway involving Src and Rac1.

Most of the available data on the regulation of APP processing concerns with sAPP secretion (for a review see Ref. 32). It is well demonstrated that the activation of muscarinic receptor induces an increased secretion of sAPP (33), and a similar phenomenon has been reported also for metabotropic glutamate receptor (34) and for serotonin receptors (35). These effects are regulated through a PKC-dependent pathway (33),

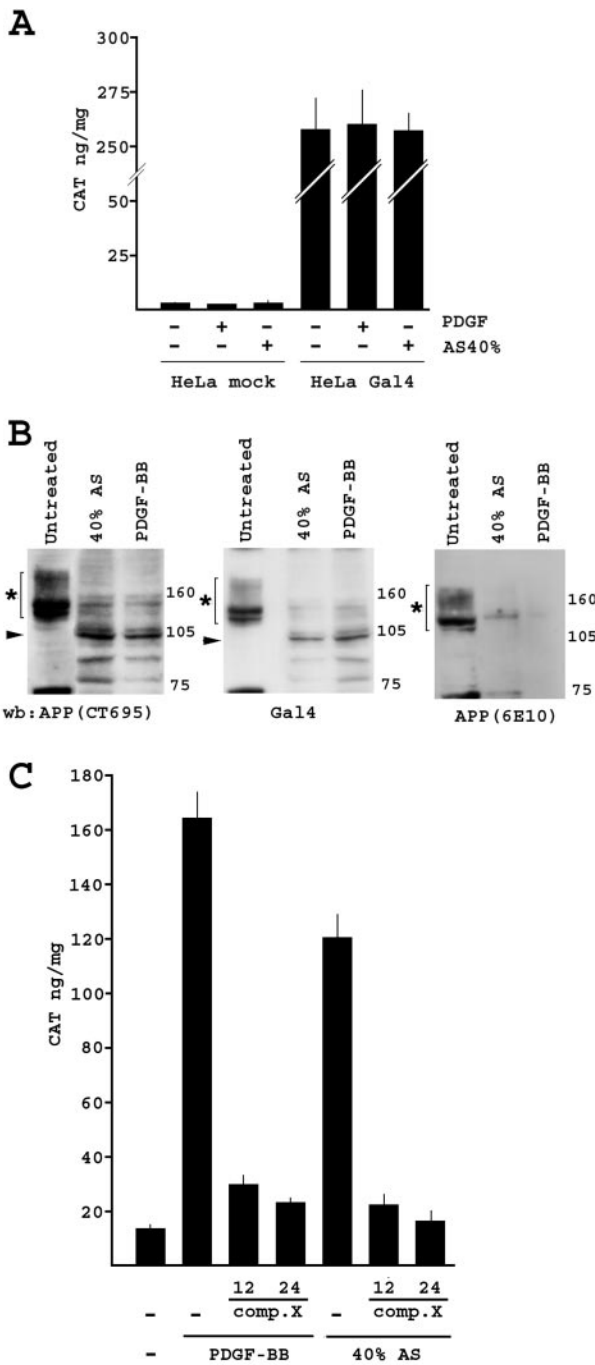


FIG. 4. PDGF-induced CAT accumulations depends on APP-Gal4 cleavage by γ -secretase activity. *A*, wild type HeLa cells were transfected with G5BCAT vector alone (mock) or with both G5BCAT vector and Gal4 expression vector (Gal4) and treated with 40 ng/ml recombinant PDGF-BB or with 10 μ g/ml of the 40% AS fraction for 24 h before harvesting. The amount of CAT was measured in triplicate experiments, and standard deviations are reported. *B*, cell extracts from HeLaAG cells exposed or not for 48 h to 40% AS fraction or to PDGF-BB were electrophoresed on SDS-PAGE and analyzed by Western blot with CT-695 or 6E10 APP antibodies or Gal4 antibody, as indicated. This demonstrated that the exposure to 40% AS fraction or PDGF-BB results in a change of the size of the APP-Gal4 bands, toward a major band of about 100 kDa, similar to that of wild type Gal4 (indicated by an arrowhead), and recognized by both Gal4 antibody and CT-695 antibody directed against the C-terminal domain of APP. On the contrary, 6E10 antibody failed to recognize the cleaved protein, thus demonstrating that it does not contain the N-terminal β -amyloid epitope. The asterisk indicates the APP-Gal4 bands. *C*, HeLaAG cells transfected with G5BCAT vector and exposed to PDGF-BB or 40% AS fraction, as in Fig. 3, were treated with 10 μ M γ -secretase inhibitor compound X for 12 or 24 h, as indicated. Standard deviations of triplicate experiments are reported.

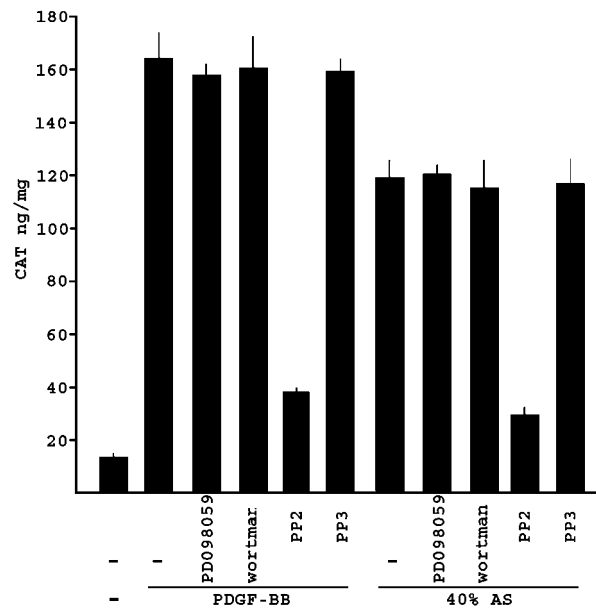


FIG. 5. Inhibition of Src TK activity prevents APP-Gal4 cleavage in HeLaAG cells exposed to either PDGF-BB or partially purified C6-conditioned medium. HeLaAG cells transiently transfected with G5BCAT vector were exposed to 40 ng/ml recombinant PDGF-BB or to 10 μ g/ml of the 40% AS fraction, as reported in Fig. 4. These cells were also treated for 24 h before harvesting with either 100 μ M ERK inhibitor PD098059, 100 nM PI3K inhibitor wortmannin, 10 μ M Src inhibitor PP2, or with a PP2-like molecule, PP3, devoid of Src TK inhibiting activity. Standard deviations of triplicate experiments are reported.

and, accordingly, it is well known that activated PKC induces sAPP secretion and inhibits $A\beta$ generation (36, 37). On the contrary, very little is known of the possible effects of the activation of tyrosine kinase receptors on APP processing.

The relevance of the reported results for neuronal APP functions and for the pathogenesis of AD should be addressed through further work. However, PDGF-R, Src, and Rac, although widely expressed in many different cell types, are known to play significant roles in the nervous system. In fact, it was clearly documented that PDGF α -receptor is expressed in neurons of various districts of mouse and rat CNS. This expression, detected as early as postnatal day 1, is observed during all the postnatal life, whereas the expression of PDGF α -receptor in oligodendrocytes is abundant during development, but is restricted in the adult to few precursor cells (38). These results are in agreement with several observations indicating a protective role for PDGF in several neuronal cells (39–41). PDGF-A and PDGF-B are constitutively expressed by neurons *in vivo* (42), and this suggests further that these growth factors, which regulate proliferation and differentiation of oligodendrocytes (42), could also regulate the functions of the neurons themselves (38). Src, and the related non-receptor TK Fyn, are expressed in the neurons, are enriched in growth cones (43), and are involved in several neuronal functions, such as for example Ig CAM-mediated neurite growth and guidance (44). The three members of the Rho family of small GTPases, Rho, Rac1, and Cdc42, are ubiquitously involved in actin cytoskeleton regulation, affecting cell attachment and contraction, lamellipodia formation, and filopodia formation, respectively (45). Their involvement in the regulation of neuronal functions is well documented. In particular, Rac has been implicated in neurite outgrowth and axonal pathfinding (46). In addition to numerous *in vitro* results, this is demonstrated by the expression of a constitutively active form of Rac1 in Purkinje cells, which resulted in an ataxic phenotype of mice that

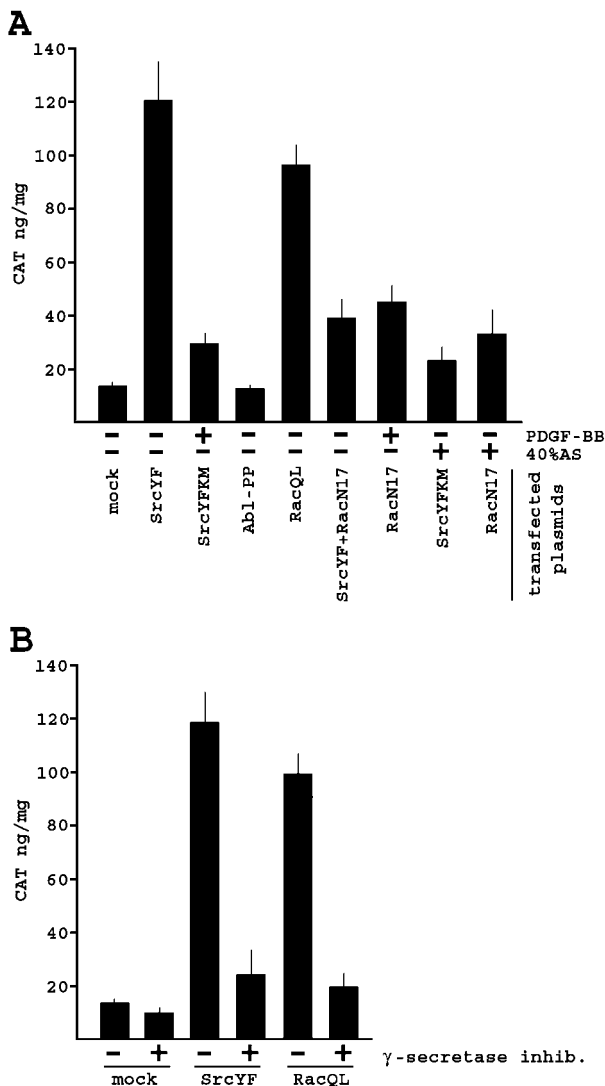


FIG. 6. The non-receptor Src TK and the small G-protein Rac1 are responsible for the PDGF-induced cleavage of APP-Gal4. *A*, HeLaAG cells transiently co-transfected with G5BCAT vector and with vectors driving the expression of constitutively active mutants of Src (SrcYF), Abl (Abl-PP), and Rac1 (RacQL) or with SrcYF plus a dominant negative mutant of Rac1 (RacN17). When indicated, HeLaAG cells were transiently transfected with the dominant negative mutants of Src (SrcYFKM) or of Rac (RacN17) and treated for 24 h before harvesting with PDGF-BB or 40% AS fraction. *B*, HeLaAG cells transiently co-transfected with G5BCAT vector and with SrcYF or RacQL expression vectors and treated or not with 10 μ M γ -secretase inhibitor, compound X. Standard deviations of triplicate experiments are reported.

is accompanied by alterations of dendritic spines (47). Accordingly, the phenotypes induced by combined mutations of the three Rac GTPases of *Drosophila* are characterized by defects of branching, guidance, and growth of axons (48).

The most known effectors of Rac1 are the PAK serine/threonine kinases, which are activated through the binding of Rac-GTP or Cdc42-GTP to their N-terminal autoinhibitory domain (for a review see Ref. 49). A second known effector downstream of Rac1 is the kinase Cdk5 (50), and the observation that APP β - γ processing is activated by Rac1 and the well demonstrated function of Rac1 in the activation of p35/Cdk5 suggest a possible crucial role for this small G-protein in the generation of the pathological signs of AD. In fact, the two histologic hallmarks of the disease are A β accumulation in senile plaques and the organization of hyperphosphorylated tau protein in fibrillary tangles. It is well demonstrated that one of the two kinases involved in anomalous tau phosphorylation is p35/Cdk5 (51),

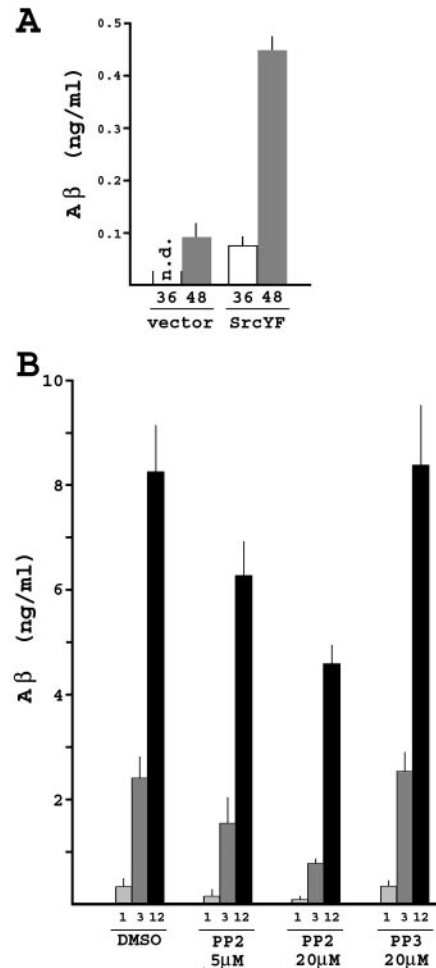


FIG. 7. Src TK activity regulates A β generation from wild type APP₆₉₅. *A*, HEK293 cells were transiently transfected with the vector encoding APP₆₉₅ with or without the vector driving the expression of the constitutively active SrcYF mutant. 36 and 48 h after transfections, total A β peptide present in the culture medium was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. In the case of the 36-h point of the cells transfected with APP alone, some measurements were below the detection limit (*n.d.*, non-detectable). *B*, CHO cells stably expressing APP₆₉₅ were exposed to 5 or 20 μ M concentrations of the Src TK inhibitor PP2 or to 20 μ M PP3. The bars indicate the amount of total A β present in the medium after 1, 3, and 12 h. The values are means of at least triplicate experiments, and standard deviations are reported.

and therefore, activation of Rac1 could, at the same time, increase A β generation and cause tau hyperphosphorylation, leading to conditions that favor plaque and tangle formation.

The results reported here support the hypothesis that other extracellular signals, different from PDGF and known to induce Src and/or Rac1, could trigger the processing of APP. In fact, numerous signaling pathways converge on Src: (i) several other tyrosine kinase receptors, such as nerve growth factor receptor, epidermal growth factor receptor, and fibroblast growth factor receptor, are able to activate Src (52–54); (ii) Src is activated by engagement of integrins during cell interaction with extracellular matrix (55); (iii) G-protein-coupled receptors activate Src, as in the case of thrombin (56, 57); and (iv) voltage-dependent and ligand-gated channels have been demonstrated to interact with Src such as, for example, the *N*-methyl-D-aspartic acid channel (58).

Among the possible targets of the pathway described above are secretases and APP. The structure of γ -secretase is not completely known, and little information is available on the regulation of BACE activity; on this basis, it is hard to hypothesize mechanisms through which these machineries could be

activated. On the other hand, there are experimental results suggesting that phosphorylation of APP does not affect its processing. In fact, it was well documented that APP is phosphorylated on Ser and Thr *in vitro* and *in vivo* (59), but these post-translational modifications are not involved in the regulation of APP cleavage (60). APP is also phosphorylated at the level of Tyr-682 (APP₆₉₅ isoform numbering) of its intracellular domain (8). One of the kinases that is able to phosphorylate APP on Tyr-682 is the non-receptor tyrosine kinase Abl. However, we showed here that the expression of a constitutively active form of Abl does not affect APP-Gal4 processing (see Fig. 6) and that, in cells expressing a mutant form of APP in which Tyr-682 is substituted with a Phe residue, SrcYF induces an increase of A β accumulation similar to that observed in cells expressing wild type APP (data not shown).

There are several results indicating that the processing of APP by γ -secretase could have a role in signal transduction (61). In fact, we and others (10, 62) demonstrated that Fe65, one of the ligands of APP cytodomain, is a nuclear protein and that APP functions as an anchor that restricts Fe65 outside of the nucleus. Following APP processing by γ -secretase, the cytodomain of APP (AID) together with Fe65 is translocated into the nucleus (10, 62–63). Fe65 and/or AID-Fe65 complex, through the interaction with the transcription factor LSF (9) or with the histone acetyltransferase Tip60 (10), could regulate the transcription. In support to this hypothesis, we found that Fe65 overexpression in the nucleus regulates the transcription of the thymidylate synthase gene driven by LSF (64). These findings suggest that PDGF, or other molecules activating the Src-Rac1 cascade, could be signals that trigger the cleavage of APP and, in turn, nuclear translocation of Fe65 and/or Fe65-AID, which regulate gene expression.

Taken together these data suggest the possibility that the activation of PDGF-R, Src, and Rac1 could be relevant for the generation of A β by neurons and that new possible targets for therapeutic interventions in Alzheimer's disease could be found in this pathway. Furthermore, the experimental system described in this report could be used to find molecules that inhibit the PDGF-Src-Rac-induced processing of APP and that, in turn, could be useful for the development of anti-AD drugs.

Acknowledgments—We thank J. Silvio Gutkind and Mario Chiariello for the Src and Rac vectors, Daniela Barilà and Giulio Superti-Furga for the Abl-PP vector, and Eddie Koo for the CHO cells expressing APP. Véronique Hubert and Thierry Canton are greatly acknowledged for A β quantification.

REFERENCES

- Vassar, R., (2001) *J. Mol. Neurosci.* **17**, 157–170
- Selkoe, D. J. (1999) *Nature* **399**, (suppl.) A23–A31
- Annaert, W., and De Strooper, B. (2002) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 25–51
- Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A., and Goldstein, L. S. (2001) *Nature* **414**, 643–648
- Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A., and Russo, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30853–30856
- Zambrano, N., Buxbaum, J. D., Minopoli, G., Fiore, F., De Candia, P., De Renzis, S., Faraonio, R., Sabo, S., Cheetham, J., Sudol, M., and Russo, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6399–6405
- Ermeikova, K. S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T., and Sudol, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32869–32877
- Zambrano, N., Bruni, P., Minopoli, G., Mosca, R., Molino, D., Russo, C., Schettini, G., Sudol, M., and Russo, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19787–19792
- Zambrano, N., Minopoli, G., de Candia, P., and Russo, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20128–20133
- Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001) *Science* **293**, 115–120
- Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B., and Herz, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33556–33560
- Howell, B. W., Lanier, L. M., Frank, R., Gertler, F. B., and Cooper, J. A. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 5179–5188
- Gertler, F. B., Comer, A. R., Juang, J. L., Ahern, S. M., Clark, M. J., Liebl, E. C., and Hoffmann, F. M. (1995) *Genes Dev.* **9**, 521–533
- Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 6229–6241
- Borg, J. P., Lopez-Figueroa, M. O., de Taddeo-Borg, M., Kroon, D. E., Turner, R. S., Watson, S. J., and Margolis, B. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 1307–1316
- Russo, C., Dolcini, V., Salis, S., Venezia, V., Zambrano, N., Russo, T., and Schettini, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35282–35288
- Tarr, P. E., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P. G., and D'Adamio, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16798–16804
- Matsuda, S., Yasukawa, T., Homma, Y., Ito, Y., Niikura, T., Hiraki, T., Hirai, S., Ohno, S., Kita, Y., Kawasumi, M., Kouyama, K., Yamamoto, T., Kyriakis, J. M., and Nishimoto, I. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 6597–6607
- Scheinfeld, M. H., Roncarati, R., Vito, P., Lopez, P. A., Abdallah, M., and D'Adamio, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 3767–3775
- Lee, S. J., Liyanage, U., Bickel, P. E., Xia, W., Lansbury, P. T., Jr., and Kosik, K. S. (1998) *Nat. Med.* **4**, 730–734
- Lillie, J. W., and Green, M. R. (1989) *Nature* **338**, 39–44
- Allegrini, S., Scaloni, A., Ferrara, L., Pesi, R., Pinna, P., Sgarrella, F., Camici, M., Eriksson, S., and Tozzi, M. G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33526–33532
- Zhang, W., and Chait, B. T. (2000) *Anal. Chem.* **72**, 2482–2489
- Westermann, R., Hardung, M., Meyer, D. K., Ehrhard, P., Otten, U., and Unsicker, K. (1988) *J. Neurochem.* **50**, 1747–1758
- Behr, D., Wrigley, J. D., Nadin, A., Evin, G., Masters, C. L., Harrison, T., Castro, J. L., and Shearman, M. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45394–45402
- Kypta, R. M., Goldberg, Y., Ulug, E. T., and Courtneidge, S. A. (1990) *Cell* **62**, 481–492
- Hirai, H., and Varmus, H. E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8592–8596
- Snyder, M. A., Bishop, J. M., McGrath, J. P., and Levinson, A. D. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**, 1772–1779
- Furtoss, O., Dorey, K., Simon, V., Barilà, D., Superti-Furga, G., and Roche, S. (2002) *EMBO J.* **21**, 514–524
- Barilà, D., and Superti-Furga, G. (1998) *Nat. Genet.* **18**, 280–282
- Chiariello, M., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 580–586
- Mills, J., and Reiner, P. B. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 443–460
- Nitsch, R. M., Slack, B. E., Wurtman, R. J., and Growdon, J. H. (1992) *Science* **258**, 304–307
- Lee, R. K. K., Wurtman, R. J., Cox, A. J., and Nitsch, R. M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8083–8087
- Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H., and Wurtman, R. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4188–4194
- Buxbaum, J. D., Gandy, S. E., Cicchetti, P., Ehrlich, M. E., Czernik, A. J., Fracasso, R. P., Ramabhadran, T. V., Unterbeck, A. J., and Greengard, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6003–6006
- Hung, A. Y., Haass, C., Nitsch, R. M., Qiu, W. Q., Citron, M., Wurtman, R. J., Growdon, J. H., and Selkoe, D. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22959–22962
- Oumesmar, B. N., Vignalis, L., and Baron-Van Evercooren, A. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 125–139
- Cheng, B., and Mattson, M. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 7095–7104
- Nikkhah, G., Odin, P., Smits, A., Tingstrom, A., Othberg, A., Brundin, P., Funa, K., and Lindvall, O. (1993) *Exp. Brain Res.* **92**, 516–523
- Smits, A., Ballagi, E., and Funa, K. (1993) *Eur. J. Neurosci.* **5**, 986–994
- Yeh, H. J., Ruit, K. G., Wang, Y. X., Parks, W. C., Snider, W. D., and Deuel, T. F. (1991) *Cell* **64**, 209–216
- Maness, P. F., Aubry, M., Shores, C. G., Frame, L., and Pfenniger, K. H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5001–5005
- Suter, D. M., and Forscher, P. (2001) *J. Cell Biol.* **155**, 427–438
- Hall, A., and Nobes, C. D. (2000) *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **355**, 965–970
- Nikolic, M. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 731–745
- Luo, L., Hensch, T. K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1996) *Nature* **379**, 837–840
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J., and Luo, L. (2002) *Nature* **416**, 442–447
- Sells, M. A., and Chernoff, J. (1997) *Trends Cell Biol.* **7**, 162–167
- Nikolic, M., Chou, M. M., Lu, W., Mayer, B. J., and Tsai, L. H. (1998) *Nature* **395**, 194–198
- Maccioni, R. B., Otth, C., Concha, I. I., and Munoz, J. P. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 1518–1527
- Kremer, N. E., D'Arcangelo, G., Thomas, S. M., De-Marco, M., Brugge, J. S., and Halegoua, S. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 809–818
- Weernink, P. A., and Rijkse, G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2264–2267
- Zhan, X., Plourde, C., Ku, X. G., Friesel, R., and Maciag, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 20221–20224
- Kaplan, K. B., Swedlow, J. R., Morgan, D. O., and Varmus, H. E. (1995) *Genes Dev.* **9**, 1505–1517
- Luttrell, L. M., Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Luttrell, D. K., and Lefkowitz, R. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4637–4644
- Chen, Y., Pouyssegur, J., Courtneidge, S. A., and Van Obberghen-Schilling, E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27372–27377
- Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., and Salter, M. W. (1997) *Science* **275**, 674–678
- Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C., and Greengard, P. (1994) *EMBO J.* **13**, 1114–1122
- da Cruz e Silva, O. A., Iverfeldt, K., Oltersdorf, T., Sinha, S., Lieberburg, I., Ramabhadran, T. V., Suzuki, T., Sisodia, S. S., Gandy, S., and Greengard, P. (1993) *Neuroscience* **57**, 873–877
- Ebinu, J. O., and Yankner, B. A. (2002) *Neuron* **34**, 499–502
- Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N., and Russo, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 6545–6550
- Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guenette, S. Y., and Selkoe, D. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 40288–40292
- Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., Hansen, U., and Russo, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 35481–35488

Mutation of the *feh-1* gene, the *Caenorhabditis elegans* orthologue of mammalian Fe65, decreases the expression of two acetylcholinesterase genes

Marida Bimonte, Davide Gianni, Danilo Allegra, Tommaso Russo and Nicola Zambrano

Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via S. Pansini, 5, 80131 Napoli, Italy and

CEINGE Biotecnologie Avanzate, Via Comunale Margherita, 482, 80145, Napoli, Italy

Keywords: Alzheimer's disease, animal models, gene regulation, molecular biology

Abstract

The molecular adaptor Fe65 is one of the cytosolic ligands of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein (APP), and this complex is believed to play important roles in mammalian cells. Upon cleavage of APP by specific processing activities, the complex between Fe65 and the APP intracellular domain (AICD) translocates to the nucleus. Experimental evidence suggests that the Fe65-AICD complex regulates gene transcription. In *Caenorhabditis elegans* the orthologue of the Fe65 gene, *feh-1*, regulates pharyngeal activity. In fact, the rate of pharyngeal contraction is increased following transient or stable suppression of the *feh-1* gene expression. Here we show that the increased contraction rate of the pharynx in *feh-1* mutant worms is associated to decreased acetylcholinesterase activity. The decreased activity is accompanied by reduced expression of *ace-1* and *ace-2* transcripts, coding for the two major acetylcholinesterase activities in the nematode. These results indicate a target of the regulatory mechanisms based on the Fe65-APP complex that could be relevant for the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Introduction

Mammalian Fe65 genes encode three homologous proteins sharing a similar modular structure. Their protein–protein interaction domains, one WW and two phosphotyrosine binding (PTB) domains, interact with several proteins. The Fe65 proteins bind the cytodomain of Alzheimer's β -amyloid precursor, APP, through their PTB2 domain (Fiore *et al.*, 1995; Guénette *et al.*, 1996; Zambrano *et al.*, 1997; Duilio *et al.*, 1998). Moreover, the WW domain of Fe65 binds to Mena and Abl (Ermeikova *et al.*, 1997; Zambrano *et al.*, 2001), while the N-terminal PTB (PTB1) interacts with the LDL-receptor related protein, LRP (Trommsdorff *et al.*, 1998) and, in the nucleus, with the transcription factor, LSF (Zambrano *et al.*, 1998), or the histone acetyltransferase, Tip60 (Cao & Sudhof, 2001). As far as the functions of the Fe65-APP complex are concerned, several hypotheses could be supported by the available experimental results. One is that APP regulates the subcellular localization of Fe65. Fe65 was in fact isolated as a brain-specific protein possessing a transcription activation domain (Duilio *et al.*, 1991). Later on, it has been shown that Fe65 is a nuclear protein and that its interaction with APP retains the protein in the cytosol (Cao & Sudhof, 2001; Minopoli *et al.*, 2001). Then, the cleavage of APP by secretases could be considered a mechanism regulating the nuclear translocation of Fe65, resembling the mechanism acting on Notch (Selkoe & Kopan, 2003). Several results suggest that Fe65 contributes to gene regulation. It, in fact, interacts with LSF to regulate the expression of thymidilate synthase gene (Bruni *et al.*, 2002) and has been found associated to chromatin on the KAI1 promoter (Baek *et al.*, 2002). Furthermore, the Fe65-AICD-Tip60

complex activates the transcription of reporter genes (Cao & Sudhof, 2001). Besides its involvement in transcription, Fe65 plays a role in cell motility (Sabo *et al.*, 2001) and in the activities leading to APP cleavage (Sabo *et al.*, 1999; Ando *et al.*, 2001; Zambrano *et al.*, 2004).

The *feh-1* gene is the *Caenorhabditis elegans* orthologue of mammalian Fe65s. It is expressed in the pharynx and in the nerve system and the encoded protein interacts with APL-1 (Zambrano *et al.*, 2002) the product of the APP orthologue (Daigle & Li, 1993). Both proteins participate to a mechanism regulating pharyngeal activity in *C. elegans*. *feh-1*-null worms either arrest during embryogenesis, or at the first larval stage. The functional defect of the arrested larvae results in impaired feeding ability, as the pharynxes of the growth-arrested worms are paralysed. Furthermore, a decreased expression of FEH-1 or APL-1 by RNA interference leads to an increased rate of pharyngeal contractions (Zambrano *et al.*, 2002). Here, we present evidence indicating that the defects observed in *feh-1* mutants are due to decreased expression of two acetylcholinesterase genes, thus suggesting that the latter could be a target of the regulatory machinery centred at the Fe65-APP complex.

Materials and methods

Nematode strains and treatments

The *C. elegans* strains used in this work were wild-type N2 Bristol, *feh-1(gb561)* (Zambrano *et al.*, 2002). The latter was genetically balanced with the *qC1 [dpy-19(e1259) glp-1(q339)]* III balancer from the strain RW3625 (*let-805(st456)/qC1*) (Hresko *et al.*, 1999). Nematodes were grown on NGM plates seeded with *Escherichia coli* OP50 as food source, and propagated according to standard procedures (Sulston *et al.*, 1988).

Correspondence: Dr Nicola Zambrano, Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, as above.

E-mail: zambrano@dbbm.unina.it

Received 2 April 2004, revised 28 June 2004, accepted 13 July 2004

The effects of pharmacological treatments were tested on randomly picked adults individually transferred to agar plates containing 0.1 mM or 0.15 mM nicotine (Sigma), or either 1 μ M or 5 μ M oxantel (Sigma) for different time-points. Pharyngeal pumping rates of the worms were measured on 20 cloned individuals from each line, or from drug-treated worms, blindly, during a 20-second period. Each experiment was repeated three times, standard deviation was calculated for each group, and for statistical comparisons Student's test was used.

Acetylcholinesterase (AChE) assays

AChE activity was assayed in total worm extracts by the method of Ellman *et al.*, 1961. Proteins from unsynchronized worms or from synchronized L1 larvae were extracted using glass beads (Sigma, Milan, Italy) in low-salt buffer (10 mM Tris/CL, pH 7.5) containing 1% Brij 97 (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (Complete, EDTA-free, Roche, Monza, Italy). The samples were sonicated and clarified by centrifugation for 15 min (15 000 \times g, 4 °C). Protein concentration was estimated with the Bradford assay (Bio-Rad, Milan, Italy), using bovine serum albumin as a standard, according to manufacturer's instruction. Triplicate aliquots of 0.15 mg of proteins were used as the enzyme source in a substrate-reagent mixture containing 1 mM acetylthiocholine iodide (Sigma), 1 mM tetraisopropylpyrophosphoramidate (Sigma), and 0.25 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoate (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The reaction was allowed to proceed for 10 min, during which the absorbance at 405 nm was detected by a spectrophotometer.

Histochemical detection of acetylcholinesterase activity was performed as previously described (Culotti *et al.*, 1981), on synchronized wild-type N2 L1 larvae, and on individually picked *feh-1* $-/-$ L1s. The staining was allowed to proceed for 4 h, then images were taken with a Zeiss Axiolab microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), connected to a digital camera.

Semi-quantitative and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

RNA samples from mechanically homogenized worms were extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milan, Italy); 1.5 μ g of each RNA sample were treated with Deoxyribonuclease I (Invitrogen/Life Technologies, San Giuliano Milanese, Italy) for 15 min at room temperature to remove residual DNA, followed by inactivation at 65 °C for 10 min. The cDNAs were obtained by reverse transcription of DNase-treated RNAs, using random hexanucleotide primers and 200 units of Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen/Life Technologies) for 50 min at 42 °C, followed by inactivation of the enzyme at 70 °C for 15 min. All primers were designed to intron/exon boundaries using the PrimerExpress software (version I, Applied Biosystems, Monza, Italy); the sizes of the amplicons were between 60 and 180 nucleotides-long. The reference transcripts for the relative quantification of the reaction products were from the *C. elegans* actin genes. The sequences of the primer sets used were the following:

ace-1, 5'-TCTGCCTTCGACGATATTAGCTG
and 5'-GAGCCATCATGGAGGTGAATG;
ace-2, 5'-TGCAAATACTGGGAAGAACCGACT
and 5'-TTCGATGCTTCCCTTGTAATGTT;
ace-3, 5'-ACGGTGATCTACACGCGACA
and 5'-GTCCTGCTGTGCTGTGGAGAC;
ace-4, 5'-TTCATTTTATTACTGTTTTTATCGATTCAG
and 5'-CACCGGATGAACCGCCT;

actin, 5'-CCAGCCATCCTTCTTGGGTATG
and 5'-CTTGATCTTCATGGTTGATGGGG.

All the primers were synthesized by the CEINGE oligonucleotide synthesis facility (Napoli, Italy). For semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the amplified products of *ace-1*, *ace-2* and *actin* transcripts were collected at different cycles, resolved on 1.5% agarose gels, blotted to nylon membranes (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Cologno Monzese, Italy), and hybridized to the cognate ³²P-labelled probes at 65 °C in a buffer containing 0.5 M sodium phosphate, 7% (w/v) sodium dodecyl-sulphate, 1 mM EDTA, pH 7.2. Detection and quantification of the hybridized probe was performed on a Storm 840 phosphorimager (Amersham Pharmacia Biotech), using the ImageQuant software. Such a quantification was used to select the linear range of amplification for semiquantitative estimation of the relative expression levels of actin, *ace-1* and *ace-2* genes.

The cDNAs from synchronized L1 larvae were used as template for quantitative real-time PCR using an ABI-Prism 7900 sequence detection system (Applied Biosystems). Reactions were performed in a volume of 25 μ L including diluted cDNA sample, SybrGreen PCR master mix (Applied Biosystems) and the different primer sets. PCR cycling conditions were 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 reaction cycles in which denaturation was carried out for 15 s at 94 °C, followed by 1 min at 60 °C for annealing and extension. Each sample was run in triplicate. For each gene the mean *Ct* value was calculated with the relative standard deviations. The mean *Ct* values of all *ace* genes were normalized against actin (ΔCt) to account for variability in the initial concentration and quality of total RNAs and in the conversion efficiency of the reverse transcription reaction. The relative expression is calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where the $\Delta\Delta Ct$ is the difference between the ΔCt values of mutant vs. wild-type worms. Melting curve analysis and agarose gel electrophoresis allowed us to verify the specificity of PCR amplifications (data not shown). No amplifications were detected in samples without template or with DNase-treated RNA not subjected to reverse transcription.

Results and discussion

feh-1 $+/-$ worms are hypersensitive to nicotine

We have already demonstrated that in *C. elegans*, inhibition of FEH-1 protein synthesis through genetic manipulation of the cognate gene, or through post-transcriptional gene silencing, achieved by RNA interference, elicits a pharyngeal phenotype. This phenotype is clearly dependent on the degree of inhibition, as worms homozygous for the *feh-1* null mutation are blocked in the first stage of larval development, due to paralysis of the pharynx, while heterozygous worms develop normally, but show an increased rate of pharyngeal contractions (Zambrano *et al.*, 2002). These results support the possibility that the absence or decreased levels of FEH-1 lead to a hypersensitivity of the pharynx to the stimuli inducing the contraction. To explore this possibility, we treated wild-type and mutant worms with the acetylcholine (ACh) receptor agonist nicotine, as pharyngeal contraction is mediated by this neurotransmitter (Raizen *et al.*, 1995; McKay *et al.*, 2004). The results of Fig. 1 show that at low concentration (0.1 mM), nicotine increases the contraction rate of the pharynx in wild-type worms to levels similar to unstimulated *feh-1* $+/-$ worms, while, following a long exposure to higher concentration (0.15 mM), the wild-type pharynx contraction becomes arrhythmic, with just few pulses being detected at longer time points. The nicotine stimulation of *feh-1* $+/-$ worms results in the apparent normalization of the contraction rate at the early time points, and to a more precocious

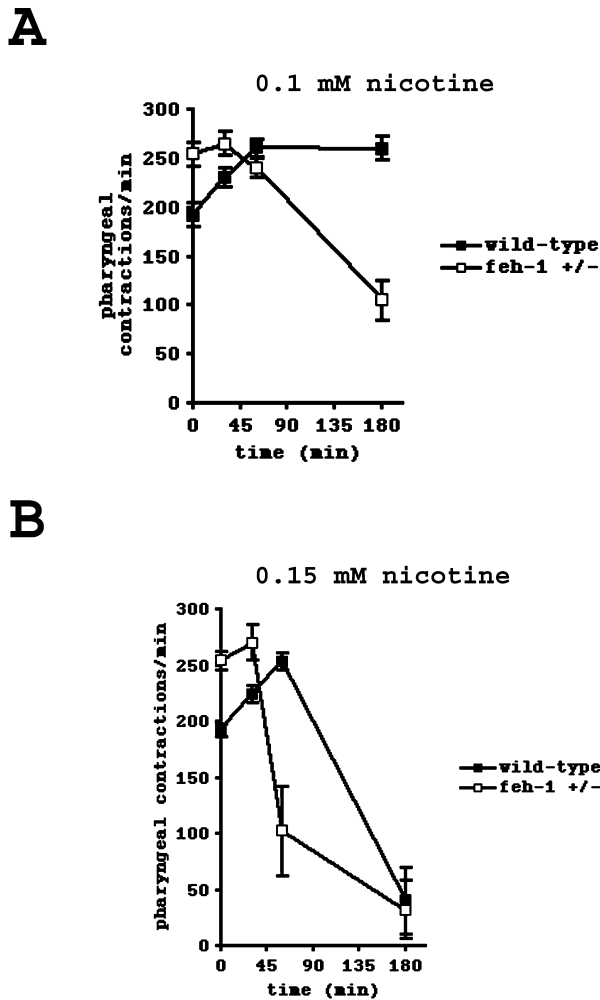


FIG. 1. Analysis of the pharyngeal response to nicotine stimulation in wild-type vs. mutant *feh-1 +/-* worms. Individual wild-type (filled box) or *feh-1* heterozygous (open box) adult worms were randomly picked from the corresponding cultures and tested for pharyngeal contraction rate after being transferred to nicotine-containing plates for the indicated times. In A, the concentration of nicotine was 0.1 mM; in B, the nicotine concentration was 0.15 mM.

appearance of arrhythmic contractions, as soon as at the lowest concentration of nicotine. The contraction rates of the pharynxes of the wild-type and *feh-1 +/-* worms become indistinguishable at the latter time points in the high dose experiment. Taken together, these results indicate that the mutant worms exhibit an increased sensitivity to acetylcholine, compared to wild-type worms.

The increased susceptibility of the heterozygous worms to nicotine stimulation could be interpreted as due to an increase in the number of ACh receptors in the pharynxes of heterozygous worms compared to wild-type worms. However, the lack of differences in the response to oxantel, an ACh antagonist, between the two populations suggests that this seems not to be the case. In fact, wild-type or *feh-1 +/-* worms were seeded on plates treated with 1 μ M or 5 μ M oxantel, and the pharyngeal contraction rate was evaluated at various time-points. As shown in Fig. 2, both wild-type and heterozygous worms show a consistent decline in pharyngeal activity, due to the insensitivity of the pharyngeal muscle to ACh stimulation. The corresponding profiles are very similar among wild-type and heterozygous worms, in both conditions used.

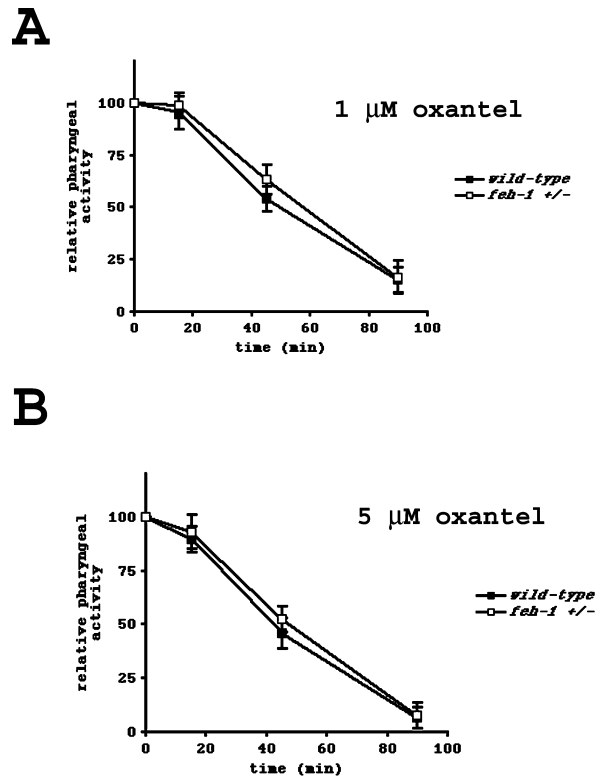


FIG. 2. Analysis of the pharyngeal response to the treatment with oxantel in wild-type vs. mutant *feh-1 +/-* worms. Individual wild-type (filled box) or *feh-1* heterozygous (open box) adult worms were randomly picked from the corresponding cultures and tested for pharyngeal contraction rate after being transferred to oxantel-containing plates for the indicated times. In A, the concentration of oxantel was 1 μ M; in B, the concentration of oxantel was 5 μ M. The vertical axis shows relative values of the pharyngeal contraction rate, expressed as a percentage of the rate determined at time 0 for both strains.

Decreased acetylcholinesterase activity in *feh-1* mutants is accompanied by down-regulation of *ace-1* and *ace-2* transcripts

One possible explanation for the increased pharyngeal contraction rate in the *feh-1* mutants could be at least partially explained by the occurrence of a higher cholinergic tone in the pharynxes of the mutant worms. This could be due to increased ACh delivery to the neuromuscular junction of the heterozygous worms, or to decreased ACh turnover. In order to test the latter hypothesis, we assayed the activity of the ACh-degrading enzyme, acetylcholinesterase, in control RW3625 (Hresko *et al.*, 1999) and in *feh-1 +/-* worms, and compared to the activity of wild-type populations. RW3625 worms possess the mutations used to keep genetically balanced the *feh-1* mutant allele, thus constitute a control population to exclude effects of this genetic background to the AChE activity. Figure 3 shows that RW3625 worms behave like wild-type worms in terms of acetylcholinesterase activity. Also the pharyngeal pumping rate of these worms is indistinguishable from wild-type worms (data not shown). Indeed, the relative AChE activity measured in *feh-1 +/-* worms is reduced to approximately 70% of the activity present in wild-type worms. As far as the *feh-1* genotype is concerned, among the mutant *feh-1* unsynchronized populations tested, the worms reaching adulthood, then fertility, are either heterozygous (50%) or wild-type (25%), and these individuals contribute to most of the protein mass present in the extracts. On the other hand, the remaining 25% of the population is composed of *feh-1*-null growth-arrested embryos (approximately 10%) and L1 larvae

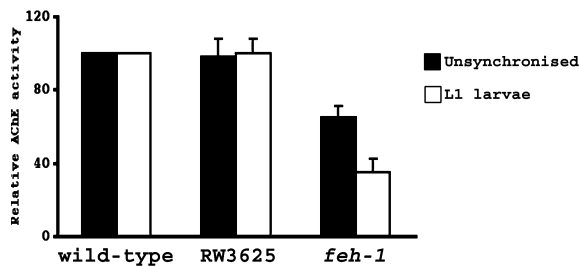


FIG. 3. Acetylcholinesterase activity is decreased in *feh-1* mutants. The enzymatic activity of acetylcholinesterase was determined in unsynchronized populations (black bars), or in synchronized L1 larvae (white bars) from wild-type, RW3625 or *feh-1* $+/-$ worms. The relative values of RW3625 and *feh-1* $+/-$ worms are presented as a percentage of the enzyme activity of wild-type worms. Standard deviations result from statistical analysis of triplicate experiments.

(approximately 15%) which, for their limited size, contribute only moderately to the protein sample used for the enzymatic assay. In order to get a more balanced population, we repeated the AChE

enzymatic assay on synchronized L1 larvae. In this case, the reduction in AChE activity drops to values close to 40% in the larval progeny (L1 stage) of *feh-1* $+/-$ heterozygous worms, compared to L1 synchronized populations from wild-type and RW3625 worms (Fig. 3). Thus, AChE activity is significantly reduced in worms with an inactivating *feh-1* mutation.

In *C. elegans*, four different genes encoding acetylcholinesterases, *ace-1* to *ace-4*, are present (Johnson *et al.*, 1981, 1988; Culetto *et al.*, 1999; Combes *et al.*, 2000), giving different relative contributions to the total AChE activity of the nematode. Among the cognate gene products, ACE-1 and ACE-2 proteins encode, respectively, for class A and class B acetylcholinesterases, respectively, and they are together responsible for most (95%) of the acetylcholinesterase activity in *C. elegans* (Combes *et al.*, 2003). We then used semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction as a tool for the analysis of the levels of the transcripts of the *ace-1* and *ace-2* genes in *feh-1* $-/-$ L1 larvae vs. wild-type L1s. The $-/-$ L1s were individually picked from the progeny of heterozygous *feh-1* mutants, as they are impaired in growth and blocked in this developmental stage. As these larvae cannot feed, we used RNA samples from starved, wild-type L1s as a control. Panels A and B of Fig. 4 show the results of a typical

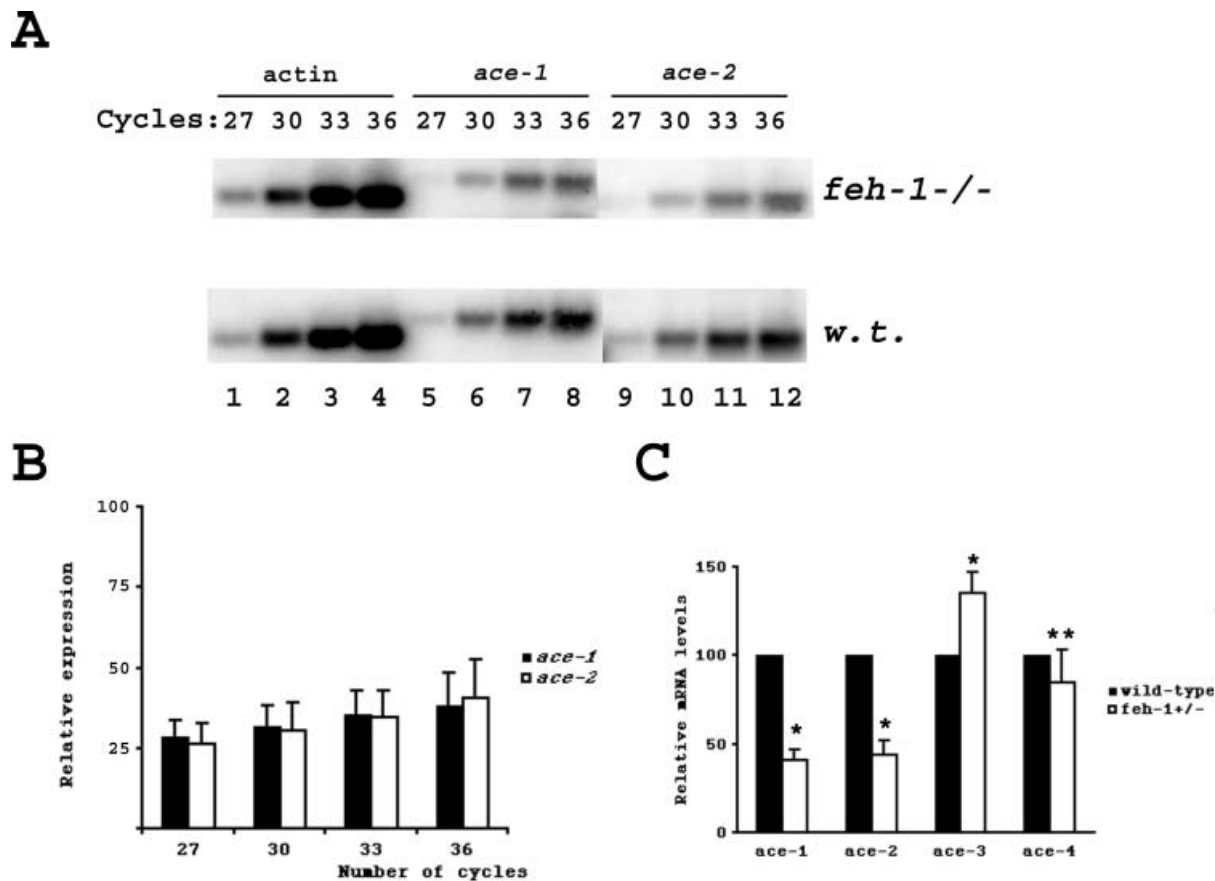


FIG. 4. Expression of acetylcholinesterase transcripts in *feh-1* mutants. (A) Semiquantitative evaluation of the expression of *ace-1* and *ace-2* transcripts in wild-type and *feh-1* $-/-$ L1 larvae. Amplification products of the actin, *ace-1* and *ace-2* cDNAs from wild-type (bottom) and *feh-1* $-/-$ (top) L1 larvae were resolved by agarose gel electrophoresis, blotted and hybridized to the corresponding 32 P-labelled probes for quantitative determinations. The figure shows typical results obtained after 27, 30, 33 and 36 cycles of amplification by PCR. (B) Relative expression of *ace-1* and *ace-2* mRNAs in mutant vs. wild-type worms. The values derive from the analysis of three experiments of semiquantitative evaluations of the expression of *ace-1* and *ace-2* transcripts (see A). The results are presented as a percentage relative expression of the two transcripts between *feh-1* $-/-$ and wild-type worms, using actin transcripts for normalization. Standard deviations derive from statistical analysis of triplicate experiments. (C) Quantitative evaluation of *ace-1*, *ace-2*, *ace-3* and *ace-4* transcripts in synchronized L1 larval populations from wild-type and *feh-1* $+/-$ worms. The values obtained for the expression of the indicated transcripts in *feh-1* mutant larvae (white bars), are presented as a percentage of the values obtained from wild-type larvae (black bars). Actin transcripts have been used for normalization. The standard deviations are derived from statistical analysis of triplicate experiments; * $P < 0.01$; **not significant.

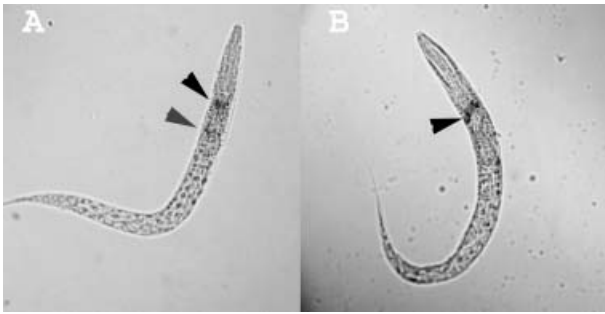


FIG. 5. Histochemical detection of acetylcholinesterase activity in representative wild-type (A) and *feh-1*^{-/-} (B) L1 larvae. The black arrowheads indicate the nerve ring of the two worms; the grey arrowhead indicates the more caudal structure, lining the anterior side of the pharyngeal terminal bulb. Magnification, 400 \times .

semiquantitative RT-PCR experiment, indicating that both *ace-1* and *ace-2* transcripts are down-regulated by *feh-1* mutation, to a similar extent; at the lowest RT-PCR cycle in which it is possible to detect the two transcripts by hybridization with complementary radioactive probes (27th cycle), the ratio between normalized expression of *ace-1* and *ace-2* transcripts indicates that the mutants, homozygous *feh-1*^{-/-} worms express four-fold less transcripts, compared to the wild-type worms. As *ace-3* and *ace-4* transcripts are less abundant than *ace-1* and *ace-2* mRNAs, we took advantage of quantitative real-time PCR to estimate the effects of *feh-1* mutation on the levels of the corresponding transcripts. The threshold cycles for appearance of the amplification products of the four *ace* genes in wild-type L1 larvae confirm that the more abundant transcripts detected derive from *ace-1* and *ace-2*, while the less abundant was from *ace-3* (data not shown). The analysis of the data obtained from quantitative RT-PCR on synchronized L1 larvae from wild-type and *feh-1*^{+/-} worms allowed a comparative analysis to be performed, shown in Fig. 4C. The levels of *ace-1* and *ace-2* genes in mutant larvae is approximately 40% of the transcript levels present in wild-type worms, while *ace-3* transcripts are slightly more abundant in the mutants than in the wild-type worms. The slight, but significant increase in *ace-3* transcripts can be interpreted as an adaptive response of the worms to reduced AChE activity. In fact, despite the absence of obvious phenotypes of *ace-3* mutants (the encoded protein is responsible for as low as 5% of the total AChE activity, see Combes *et al.*, 2000), this gene is able to keep the uncoordinated *ace-1/ace-2* double mutant viable, while the triple mutant is lethal (Johnson *et al.*, 1988). No statistically relevant differences were detected in the relative levels of *ace-4* transcripts. Although expressed in *C. elegans*, *ace-4* is believed to be a nonfunctional gene because of defective *cis*-splicing of its transcripts, and because of a putative nonfunctional amino acid sequence surrounding the Ser residue at the active site (Combes *et al.*, 2003). Taken together, these observations suggest that the reduced AChE activity of *feh-1* mutant worms is due to down-regulation of the expression of *ace-1* and *ace-2* genes. However, considering that the *feh-1* knock-out only affects pharyngeal pumping and not other muscular functions of the worms, we have explored whether the regulation of *ace* genes by FEH-1 is restricted to specific districts of the worms.

To do this, we performed *in situ* acetylcholinesterase enzyme assays, in whole mount preparations of wild-type and *feh-1*^{-/-} L1s. The wild-type larvae show the already described staining of two main structures in the cephalic half of the worms (Culotti *et al.*, 1981). The most rostral of these structures corresponds to the nerve ring (black

arrowhead in Fig. 5A), while the most caudal one (grey arrowhead in Fig. 5A) lines the upper side of the pharyngeal terminal bulb. The *in situ* enzyme assay of the *feh-1*^{-/-} larvae showed that acetylcholinesterase activity of the most caudal structure is completely lost (Fig. 5B), while that of the most rostral structure is unaffected. These results do not exclude the possibility that *feh-1* controls the expression of acetylcholinesterase genes also in other districts, where the expression is below the detection limit of the histochemical staining, but in any case the strength and specificity of the effects of *feh-1* ablation in a restricted area of the pharyngeal region is striking. Besides the relevance of these events for regulation of local acetylcholinesterase activity, these results support the hypothesis of the crucial contribution of *ace* gene down-regulation to the generation of the *feh-1* mutant phenotype.

The data presented in this paper allow the first description of a functional role for Fe65 in a living organism. The identification of acetylcholinesterase as a downstream target of Fe65 activity in *C. elegans* strengthens the involvement of this protein in the molecular mechanisms, whose de-regulation may lead to Alzheimer's disease. In fact, the so-called cholinergic hypothesis formulated to explain Alzheimer's pathogenesis suggested that loss of cholinergic neurotransmission is responsible for the cognitive decline of these patients (Coyle *et al.*, 1983). This hypothesis has been challenged by numerous experimental results, but inhibitors of acetylcholinesterase are still used as drugs to alleviate Alzheimer's disease symptoms (Doody, 2003). The results presented in this paper do not affect the concerns about the data supporting the cholinergic hypothesis, but should be taken into account as they suggest that perturbing the function of the APP-Fe65 complex could have consequences on the expression of acetylcholinesterase genes also in mammals. Further studies are needed to address this possibility and to examine whether it could have any effect on the early steps of the development of the disease.

Acknowledgements

The authors wish to thank P. Bazzicalupo for valuable advice. The authors express their gratitude to the *C. elegans* Genetic Centre, CGC, for providing the mutant strains used in this paper. This work has been supported by grants from Italian Ministry of Health-Regione Campania (Progetto Alzheimer), MIUR-FIRB RBNE0IYW7B, Biogem-Italy and EC grant CT-2003-503330 to T.R. and from MIUR - PRIN 2003 to N.Z.

Abbreviations

ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; APP, Alzheimer's β -amyloid precursor protein; PCR, polymerase chain reaction; PTB, phosphotyrosine binding; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

References

- Ando, K., Iijima, K.I., Elliott, J.I., Kirino, Y. & Suzuki, T. (2001) Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40353-40361.
- Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (2002) *Cell*, **110**, 55-67.
- Bruni, P., Minopoli, G., Brancaccio, T., Napolitano, M., Faraonio, R., Zambrano, N., Hansen, U. & Russo, T. (2002) Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by downregulating thymidylate synthase expression. *J. Biol. Chem.*, **277**, 35481-35488.
- Cao, X. & Sudhof, T.C. (2001) A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**, 115-120.

- Combes, D., Fedon, Y., Grauso, M., Toutant, J.P. & Arpagaus, M. (2000) Four genes encode acetylcholinesterases in *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. cDNA sequence, genomic structures, mutations and *in vivo* expression. *J. Mol. Biol.*, **300**, 727–742.
- Combes, D., Fedon, Y., Toutant, J.P. & Arpagaus, M. (2003) Multiple *ace* genes encoding acetylcholinesterases of *Caenorhabditis elegans* have distinct tissue expression. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 497–512.
- Coyle, J.T., Price, D.L. & DeLong, M.R. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, **219**, 1184–1190.
- Culetto, E., Combes, D., Fedon, Y., Roig, A., Toutant, J.P. & Arpagaus, M. (1999) Structure and promoter activity of the 5' flanking region of *ace-1*, the gene encoding acetylcholinesterase of Class A in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.*, **290**, 951–966.
- Culotti, J.G., Von Ehrenstein, G., Culotti, M.R. & Russel, R.L. (1981) A second class of acetylcholinesterase-deficient mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **97**, 281–305.
- Daigle, I. & Li, C. (1993) *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 12045–12049.
- Doody, R.S. (2003) Current treatments for Alzheimer's disease: cholinesterase inhibitors. *J. Clin. Psychiatry*, **64**, 11–17.
- Duilio, A., Faraonio, R., Minopoli, G., Zambrano, N. & Russo, T. (1998) Fe65L2: a new member of the Fe65 protein family interacting with the intracellular domain of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *Biochem. J.*, **330**, 513–519.
- Duilio, A., Zambrano, N., Mogavero, A.R., Ammendola, R., Cimino, F. & Russo, T. (1991) A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 5269–5274.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterases activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88–95.
- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. & Sudol, M. (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with the proline-rich motif of Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* Enabled. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32869–32877.
- Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A. & Russo, T. (1995) The regions of the Fe65 protein homologous to the PID/PTB domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30853–30856.
- Guénette, S.Y., Chen, J., Jondro, P.D. & Tanzi, R.E. (1996) Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 10832–10837.
- Hresko, M.C., Schriefer, L.A., Shrimankar, P. & Waterston, R.H. (1999) Myotactin, a novel hypodermal protein involved in muscle-cell adhesion in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.*, **146**, 659–672.
- Johnson, C.D., Duckett, J.G., Culotti, J.G., Herman, R.K., Meneely, P.M. & Russel, R.L. (1981) An acetylcholinesterase-deficient mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **97**, 261–279.
- Johnson, C.D., Rand, J.R., Herman, R.K., Stern, B.D. & Russel, R.L. (1988) The acetylcholinesterase genes of *C. elegans*: identification of a third gene (*ace-3*) and mosaic analysis of a synthetic lethal phenotype. *Neuron*, **1**, 165–173.
- McKay, J.P., Raizen, D.M., Gottschalk, A., Schafer, W.R. & Avery, L. (2004) *eat-2* and *eat-18* are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics*, **166**, 161–169.
- Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Zambrano, N. & Russo, T. (2001) The beta-amyloid precursor protein APP functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6545–6550.
- Raizen, D.M., Lee, R.Y. & Avery, L. (1995) Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **141**, 1365–1382.
- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D. & Greengard, P. (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J. Cell Biol.*, **153**, 1403–1414.
- Sabo, S.L., Lanier, L.M., Ikin, A.F., Khorikova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P. & Buxbaum, J.D. (1999) Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7952–7957.
- Selkoe, D. & Kopan, R. (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 565–597.
- Sulston, J.E. & Hodgkin, J.G. (1988) In Wood, W.B., (Eds), *Methods in the Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 587–606.
- Trommsdorff, M., Borg, J.P., Margolis, B. & Herz, J. (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33556–33560.
- Zambrano, N., Bimonte, M., Arbucci, S., Gianni, D., Russo, T. & Bazzicalupo, P. (2002) *feh-1* and *apl-1*, the *Caenorhabditis elegans* orthologues of mammalian Fe65 and beta-amyloid precursor protein genes, are involved in the same pathway that controls nematode pharyngeal pumping. *J. Cell Sci.*, **115**, 1411–1422.
- Zambrano, N., Bruni, P., Minopoli, G., Mosca, R., Molino, D., Russo, C., Schettini, G., Sudol, M. & Russo, T. (2001) The beta-amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene. *J. Biol. Chem.*, **276**, 19787–19792.
- Zambrano, N., Buxbaum, J.D., Minopoli, G., Fiore, F., de Candia, P., De Renzis, S., Faraonio, R., Sabo, S., Cheetham, J., Sudol, M. & Russo, T. (1997) Interaction of the phosphoprotein interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6399–6405.
- Zambrano, N., Gianni, D., Bruni, P., Passaro, F., Telese, F. & Russo, T. (2004) Fe65 is not involved in the PDGF-induced processing of Alzheimer's amyloid precursor protein, while activates its caspase-directed cleavage. *J. Biol. Chem.*, **279**, 16161–16169.
- Zambrano, N., Minopoli, G., de Candia, P. & Russo, T. (1998) The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20128–20133.