

探讨CLU调控Tau病理参与阿尔茨海默病的发病机制

周杰^{1,2}, 朱建英^{1,2}, 马雅茹^{1,2}, 杨平^{2*}

¹宁夏医科大学临床医学院, 宁夏 银川

²宁夏医科大学总医院神经内科, 宁夏 银川

收稿日期: 2024年4月11日; 录用日期: 2024年5月6日; 发布日期: 2024年5月13日

摘要

目的: 探讨CLU调控Tau进而参与阿尔茨海默病的可能发病机制。方法: 1) 通过慢病毒转染人源性SH-SY5Y神经细胞构建CLU表达水平细胞模型, 利用RT-qPCR、Western-blotting等方法检验细胞模型中CLU及Tau蛋白表达量。2) 利用QPCR技术在转录水平验证CLU的干扰和过表达, 以及CLU干扰和过表达后对Tau的影响。结果: 1) 利用CLU质粒转染至SH-SY5Y细胞中及正常SH-SY5Y细胞的cDNA为模板, 通过RT-qPCR检测Tau在CLU过表达模型细胞中表达量明显高于正常组。2) 发现CLU的过表达同时会引起Tau表达量的增高, 而CLU的干扰同时会引起Tau表达量的降低。结论: 通过CLU质粒转染及过表达, 调控Tau蛋白播散参与, 从而引起阿尔茨海默病的发生。

关键词

CLU, Tau蛋白, 阿尔茨海默病, 发病机制

Exploring the Mechanism of CLU Regulating Tau Pathology in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease

Jie Zhou^{1,2}, Jianying Zhu^{1,2}, Yaru Ma^{1,2}, Ping Yang^{2*}

¹Clinical Medicine School of Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

²Department of Neurology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia

Received: Apr. 11th, 2024; accepted: May 6th, 2024; published: May 13th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 周杰, 朱建英, 马雅茹, 杨平. 探讨 CLU 调控 Tau 病理参与阿尔茨海默病的发病机制[J]. 临床医学进展, 2024, 14(5): 567-575. DOI: 10.12677/acm.2024.1451464

Abstract

Objective: To explore the possible mechanism by which CLU regulates Tau and participates in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Method:** 1) A CLU expression level cell model was constructed by transfecting human SH-SY5Y neural cells with lentivirus, and the expression levels of CLU and Tau proteins in the cell model were tested using RT qPCR, Western blotting, and other methods. 2) Using QPCR technology to verify the interference and overexpression of CLU at the transcriptional level, as well as the impact of CLU interference and overexpression on Tau. **Result:** 1) Using CLU plasmid transfection into SH-SY5Y cells and cDNA from normal SH-SY5Y cells as templates, the expression level of Tau in CLU overexpression model cells was significantly higher than that in the normal group detected by RT qPCR. 2) It was found that overexpression of CLU can also cause an increase in Tau expression, while interference from CLU can also lead to a decrease in Tau expression. **Conclusion:** By transfecting and overexpressing the CLU plasmid, the diffusion of Tau protein is regulated, leading to the occurrence of Alzheimer's disease.

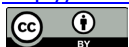
Keywords

CLU, Tau Protein, Alzheimer's Disease, Pathogenesis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的神经系统变性疾病,是痴呆最常见的类型,困扰着世界范围内的 AD 患者近 5000 万人,我国 AD 患者约 900 多万人[1]。该病往往隐匿起病,逐步出现进行性的记忆缺失、认知功能下降和行为异常[2]。AD 的主要病理特征为神经原纤维缠结和神经炎性斑块形成,近几年多项 AD 全基因组关联分析(Genome wide association studies, GWAS)发现了一些除 ApoE 以外与 SAD 相关基因,其中与 AD 风险最密切的聚集素 CLU (Clusterin) [3]。我们的前期研究结果与国外高加索人群中大型 GWAS 研究的报道一致,亦验证了多态位点 CLU rs1113600 是 AD 的发病风险之一,但 CLU 具体如何参与 AD 的发病机制尚不清楚,因此本研究探索 CLU 如何参与 AD 的发病机制,具有重要的临床意义。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP-Puro cDNA Cloning and Expression Vector (VT8070, YouBio), SH-SY5Y 人神经母细胞瘤(上海中科院细胞库),慢病毒包装辅助质粒(REB, GAG, VSV-G),高保真聚合酶 2 × Pfu PCR MasterMix (TIANGEN, KP201-02), FastDigest XbaI (Thermo Fisher Scientific, FD0684), FastDigest BamHI (Thermo Fisher Scientific, FD0054), T4 DNA 连接酶(TIANGEN, RT406), DH5 α 感受态大肠杆菌(TIANGEN, CB101), Tau 过表达质粒载体(从西安依科生物技术有限公司 EX-Z2846-M98),蛋白上样缓冲液,碧云天。

2.2. 实验方法

2.2.1. CLU 过表建立

1) CLU 过表达克隆引物序列

利用 Primer 6.0 软件设计出两对巢式引物，并在第二轮引物添加上特异性酶切位点以便与相应的载体连接(见表 1)，PCR 引物由公司合成。

Table 1. PCR primers sequence of CLU gene
表 1. 基因 CLU PCR 引物序列

第一轮 PCR 引物	
CLU-cloneF	GCGTGAGTCATGCAGGTTTG
CLU-cloneR	AAGAGGACCCTCCAAGCGAT
第二轮 PCR 引物	
CLU-cloneF	CTAGTCTAGAATGATGAAGACTCTGCTGCTGTTT
CLU-cloneR	CGGGATCCTCACTCCTCCCGGTGCTTTT

2) CLU 基因的克隆

目的片段大小约 1370 bp，我们可以看到在 1000~1500 bp 间存在目的条带，克隆成功，将获得的目的条带切胶回收，回收利用 TIANGEN 的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行。

3) 重组质粒与空质粒的转化

已转化 CLU 过表达质粒的大肠杆菌涂布含有 100 µg/mL 的氨苄的 LB 平板上，成功长出菌落，代表转化成功。

4) CLU 过表达质粒的 PCR 检测

CLU 过表达质粒的凝胶电泳检测与 PCR 检测结果，我们可以看到，空质粒载体无目的条带，排除空质粒载体可能存在的干扰，重组 CLU 过表达质粒 1000~1500 bp 间出现了目的条带，这与 CLU 基因 1350 bp 的位置相符，结果表明质粒构建成功。

5) 慢病毒过表达质粒的测序

CLU 过表达载体插入序列有一个碱基的突变，但没有影响氨基酸序列，同时与其他实验室克隆的 CLU 序列比对后发现与绝大部分实验室克隆结果相同。与韩家淮院士收藏的 CLU cDNA 序列比对，100% 相符。

6) 慢病毒滴度测定

对包装完成的慢病毒进行滴度测定，将包装出来的过表达及干扰慢病毒分别进行倍比梯度稀释，在 293T 细胞上对包装出的慢病毒颗粒进行其滴度的测定，选择发绿色荧光数目适中孔，数出具体阳性细胞数目，根据公式计算，过表达 CLU 及空载体的各种慢病毒滴度大约为 $5\sim10 \times 10^9$ TU/mL 范围内，能满足后续试验要求。

7) 慢病毒介导的 CLU 基因过表达效果的鉴定

将包装出的 LV-CLU 重组慢病毒以 MOI = 1.0 在聚凝胺的辅助下分别感染细胞合度达到 60%~70%的 SH5Y-5Y 细胞，同时未感染 LV-ORF3 重组慢病毒的 SH5Y-5Y 细胞作为空白对照。37℃培养 72 h 时，进行细胞样品的收集和对 CLU 的 Qpcr 检测结果，可见慢病毒介导的 CLU 基因在被感染的 SH5Y-5Y 细胞中成功过表达，可以用于后续试验。

2.2.2. CLU 干扰体系的建立

1) CLU 干扰双链的合成

用 siCLU-F 1 μ L, siCLU-R 1 μ L, 10 $\times$ T4 Ligation buffer 1 μ L, ddH₂O 7 μ L 的体系, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min 缓慢降至 25 $^{\circ}$ C, 退火形成双链保存, 并且利用 EcorI、BamHI 酶切酶切质粒 pSIH1-H1-copGFP-T2A-Puro (见表 2)。

Table 2. Interference and negative control sequence of CLU gene
表 2. CLU 基因的干扰与无义对照序列

CLU 干扰序列	
siCLU-F	GATCCGACAGACGGTCTCAGACAATCTTCCTGTCAGAATTGTCTGAGACCGTCTGGTCTTTTGTG
siCLU-R	AATTCAAAAAGACCAGACGGTCTCAGACAATTCTGACAGGAAGATTGTCTGAGACCGTCTGGTC G
无义对照序列	
siNC-F	GATCCTTCTCCGAACGTGTCACGTGTGAAGCAGATGACGTGACACGTTCGGAGAATTTTGTG
siNC-R	AATTCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCGTGACAGGAAGACGTGACACGTTCGGAGAAG

2) CLU 慢病毒干扰质粒与空质粒的转化

已转化 CLU 干扰质粒的大肠杆菌涂布含有 100 μ g/mL 的氨苄的 LB 平板上, 成功长出菌落, 代表转化成功。

3) 慢病毒过表达质粒的测序

将测序所得的插入载体序列与我们所涉及的 CLU 干扰序列进行比对, 发现其与 CLU 干扰序列 100% 匹配, 表明 CLU 干扰载体测序成功。

4) 慢病毒滴度测定

对包装完成的慢病毒进行滴度测定, 将包装出来的过表达及干扰慢病毒分别进行倍比梯度稀释, 在 293T 细胞上对包装出的慢病毒颗粒进行其滴度的测定, 选择发绿色荧光数目适中孔, 数出具体阳性细胞数目, 根据公式计算, 干扰 CLU 的各种慢病毒滴度大约为 $5\sim 10 \times 10^9$ TU/mL 范围内, 能满足后续试验要求。

5) Tau 过表达质粒与空质粒的转化

已转化 Tau 过表达质粒的大肠杆菌涂布含有 100 μ g/mL 的氨苄的 LB 平板上, 成功长出菌落, 代表转化成功。

6) Tau 过表达质粒的测序

将测序所得的插入载体序列与 Tau 的 CDS 序列进行比对, 发现有一个碱基突变, 密码子由 CCG 突变为 CCA, 但此突变为同义突变, 并未影响到 TAU 蛋白的表达, 不影响使用使用, Tau 过表达载体测序成功, 所测质粒序列如下:

>_tauzhili(1)_1810102993Z.seq.Contig1。

2.3. 过表达 CLU 对神经细胞 tau 表达的影响

2.3.1. 转录水平的测定

利用 QPCR 技术在转录水平验证 CLU 的干扰和过表达, 以及 CLU 干扰和过表达后对 Tau 的影响, 我们发现 CLU 的过表达同时会引起 Tau 表达量的增高, 而 CLU 的干扰同时会引起 Tau 表达量的降低。

2.3.2. 蛋白水平的测定

利用 Western Blotting 技术在转录水平验证 CLU 的干扰和过表达，以及 CLU 干扰和过表达后对 Tau 的影响，我们发现 CLU 的过表达同时会引起 Tau 表达量的增高，而 CLU 的干扰同时会引起 Tau 表达量的降低。

3. 统计学分析

应用 SPSS22.0 分析软件进行分析，计数资料选用卡方检验；数据采用 $\text{mean} \pm S$ ，两样本采用 T 检验，多组间比较通过单因素方差(ANOVA)分析法， $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

4. 结果

1) 成功构建 CLU 基因的重组质粒及空转质粒，通过 RT-PCR 及 SDS-PAG 凝胶电泳检测，结果表明空质粒载体无目的条带，排除空质粒载体可能存在的干扰，重组 CLU 过表达质粒在 1000~1500 bp 间出现了目的条带，与 CLU 基因 1350 bp 的位置相符，结果表明质粒构建成功(图 1)。

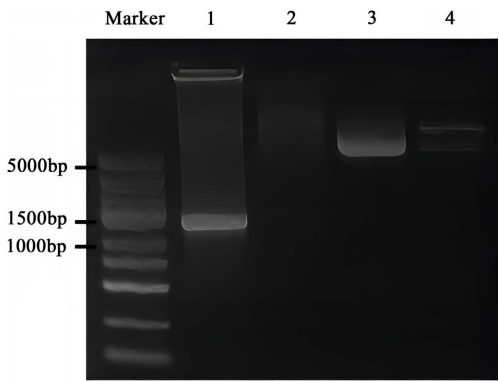


Figure 1. 1, 2 represent PCR detection of CLU genes in recombinant plasmids and empty vector plasmids, while 3 and 4 represent electrophoresis detection of recombinant plasmids and empty vector plasmids, respectively

图 1. 1、2 为分别为重组质粒和空载体质粒 CLU 基因的 PCR 检测，3、4 分别为重组质粒和空载体质粒的电泳检测

2) 将 CLU 质粒转染至 SH-SY5Y 细胞中及正常 SH-SY5Y 细胞的 cDNA 为模板，进行 RT-qPCR 检测 Tau 在 CLU 过表达模型细胞中表达量明显高于正常组(图 2)。

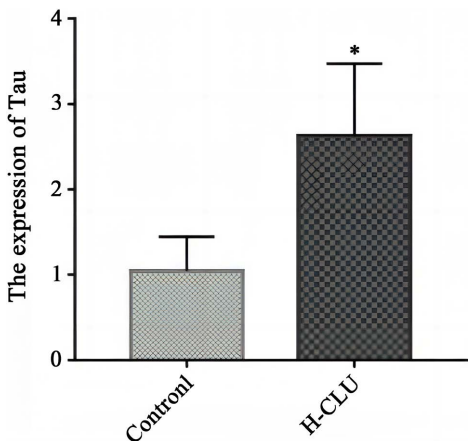


Figure 2. RT-PCR detection of Tau in neural cells of normal group and CLU high expression group

图 2. Tau 在正常组与 CLU 高表达组神经细胞的 RT-PCR 检测

3) 慢病毒过表达质粒的测序(详见图 3)。

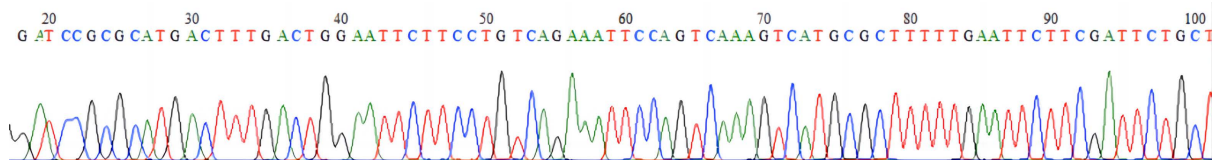


Figure 3. CLU interference plasmid sequencing peak diagram

图 3. CLU 干扰质粒测序峰图

4) 利用 QPCR 技术在转录水平验证 CLU 的干扰和过表达, 以及 CLU 干扰和过表达后对 Tau 的影响, 我们发现 CLU 的过表达同时会引起 Tau 表达量的增高, 而 CLU 的干扰同时会引起 Tau 表达量的降低(图 4、图 5)。

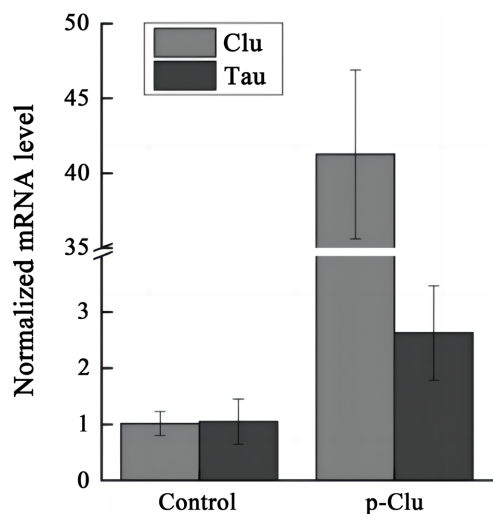


Figure 4. QPCR detection of genes CLU and Tau

图 4. 基因 CLU 及 Tau 的 QPCR 检测

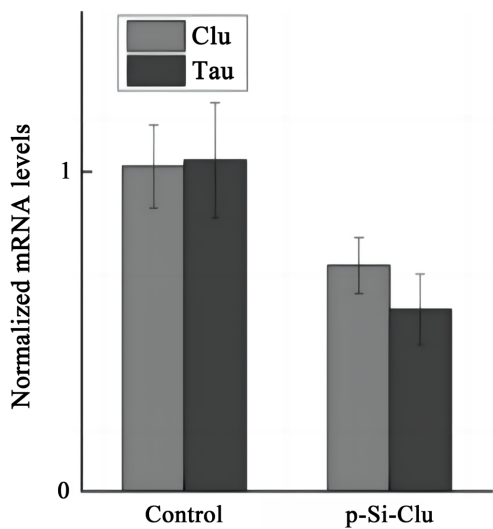


Figure 5. QPCR detection of genes CLU and Tau

图 5. 基因 CLU 及 Tau 的 QPCR 检测

5) 利用 Western-blotting 技术在转录水平验证 CLU 的干扰和过表达, 以及 CLU 干扰和过表达后对 Tau 的影响, 我们发现 CLU 的过表达同时会引起 Tau 表达量的增高, 而 CLU 的干扰同时会引起 Tau 表达量的降低(图 6、图 7)。

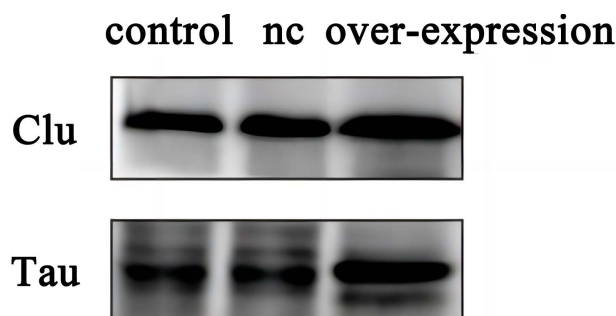


Figure 6. WB detection of CLU and Tau
图 6. CLU 及 Tau 的 WB 检测

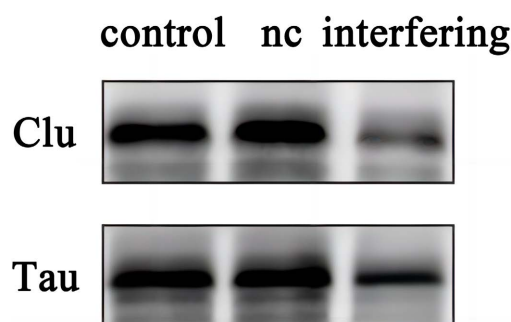


Figure 7. WB detection of CLU and Tau
图 7. CLU 及 Tau 的 WB 检测

5. 讨论

聚集素 CLU (Clusterin) 是一种存在于人体组织及体液中的较新的凋亡相关蛋白, CLU 基因位于人类染色体 8p21-12, 包括 9 个外显子, 编码 449 个氨基酸组成的多肽链[4], CLU 参与多种生理功能: 脂质代谢、免疫系统、炎症反应, 细胞凋亡、细胞周期调节, 细胞的内吞作用等[5]。其改变与额颞叶痴呆等相关。CLU 是一种独特的糖蛋白, 具有分子伴侣功能, 为脑内第二大糖蛋白, 由神经元和星形细胞分泌, 与 APOE 具有类似的功能, 参与 $A\beta$ 的清除等[6] [7]。CLU 其最重要的一个功能是介导细胞的内吞作用, 同时 CLU 在调节肌动蛋白细胞骨架方面亦具有潜在作用[8]。此外, CLU 可能通过与维持微管稳定的蛋白结合, 从而调节微管结构的稳定性。这提示 CLU 可能参与调节 Tau 蛋白相关通路从而参与 AD 的发病机制。

近年国内外研究证实 CLU 参与 AD 的发病风险。国外学者研究显示: CLU 在脑组织中高度表达, 尤其在 AD 病人海马和内嗅皮层显著增高[9], 且与正常对照相比 CLU mRNA 水平和 Clusterin 在 AD 患者增高[10]。

近年来国内外研究表明 CLU 多态性与 AD 的发生有相关性, 具体发病机制不是很清楚, 我们研究表明 CLU 质粒转染至 SH-SY5Y 细胞中及正常 SH-SY5Y 细胞的 cDNA 为模板, 进行 RT-qPCR 检测 Tau 在 CLU 过表达模型细胞中表达量明显高于正常组, 证实 CLU 参与 AD 的发生, 进一步利用 QPCR 技术在转录水平验证 CLU 的干扰和过表达, 以及 CLU 干扰和过表达后对 Tau 的影响, 我们发现 CLU 的过表达同

时会引起 Tau 表达量的增高,而 CIU 的干扰同时会引起 Tau 表达量的降低,且在蛋白水平,我们发现 Clu 的过表达同时会引起 Tau 表达量的增高,而 CIU 的干扰同时会引起 Tau 表达量的降低,可能导致正常神经元结构破坏,神经细胞功能障碍;随着神经元突触数量减少,神经纤维缠结形成,海马正常结构功能降低甚至消失,导致 AD 的发生。另外,AD 属于遗传和环境因素的共同作用可能发病的根本原因[11][12],家族成员中有过敏性疾病史是本病的最强风险因素,遗传因素主要影响皮肤屏障功能与免疫平衡。本病患者往往有多种免疫学异常,其中 Th2 细胞活化为重要特征,还可有皮肤屏障功能减弱或破坏如表皮中聚丝蛋白减少或缺失。环境因素包括气候变化、生活方式改变、不正确的洗浴、感染原和变应原刺激等。生活方式及环境暴露等可能通过表观遗传修饰引起免疫系统与皮肤屏障异常,参与 AD 的发病。此外,心理因素也在 AD 的发病中发挥一定作用。有关 CIU 蛋白的细胞之间物质运输作用,相关研究证实了 CIU 蛋白可通过膜上 megalin/gp330 受体介导细胞之间物质的运输[13],进而,推测 Tau 蛋白单体及 Tau 重组蛋白进入神经细胞中是通过 CIU 蛋白调控 megalin/gp330 受体介导的。megalin/gp330,又名低密度脂蛋白受体相关蛋白 2 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 2, LRP2),是一种多配体受体的膜蛋白,可包括 Clusterin 在内等多项脂蛋白结合,同时大量病例-对照研究证实, megalin 与 AD 存在相关性[14][15][16];多项研究均表明 megalin 可作为一种清道夫受体,调控细胞间物质的胞吐及胞吞作用,参与细胞间物质的转运[17],因,CLU 可能通过调配 megalin 受体作用于外源性 Tau 蛋白胞吞进入神经元胞内。通过构建体内外 CLU 基因表达模型,在体离及在体研究发现 CLU 基因可介导 Tau 病理改变导致 AD 发生。进而对于 CLU 表达量增多产生细胞毒性;还是 megalin/gp330 受体发挥调控发生作用;或者是 Tau 蛋白“种子”发挥聚集效应;进而促进 CLU 表达增多是否可调控 Tau 在神经元内病理播散导致胞内 Tau 蛋白的增加,从而导致 AD 的形成,需要进一步研究证实,不仅在离体及在体验证,需进一步在临床病人血液及脑脊液进行证实,可能将来为 AD 治疗带来新的治疗靶点。

6. 结论

通过 CLU 质粒转染及过表达,调控 Tau 蛋白播散参与,从而引起阿尔茨海默病的发生。

基金项目

2020 度自然科学基金: 2020AAC03415。

参考文献

- [1] Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J. and Van Der Flier, W.M. (2021) Alzheimer's Disease. *Lancet*, **397**, 1577-1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- [2] Braak, H. and Braak, E. (1991) Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes. *Acta Neuropathologica*, **82**, 239-259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- [3] Corneveaux, J.J., Myers, A.J., Allen, A.N., Pruzin, J.J. and Ramirez, M. (2010) Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's Disease in a Cohort of Clinically Characterized and Neuropathologically Verified Individuals. *Human Molecular Genetics*, **19**, 3295-3301. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq221>
- [4] De Silva, H.V., Harmony, J.A., Stuart, W.D., Gil, C.M. and Robbins, J. (1990) Apolipoprotein J: Structure and Tissue Distribution. *Biochemistry*, **5**, 5380-5389 <https://doi.org/10.1021/bi00474a025>
- [5] Trougakos, I.P. and Gonos, E.S. (2002) Clusterin/Apolipoprotein J in Human Aging and Cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**, 1430-1448. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00041-9)
- [6] DeMattos, R.B., Cirrito, J.R., Parsadanian, M., May, P.C. and O'Dell, M.A. (2004) ApoE and Clusterin Cooperatively Suppress A β Levels and Deposition: Evidence That ApoE Regulates Extracellular A β Metabolism *in Vivo*. *Neuron*, **41**, 193-202. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00850-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00850-X)
- [7] Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H. and DeMattos, R.B. (2011) Human ApoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- β Peptide Clearance. *Science Translational Medicine*, **3**, 89ra57. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002156>

-
- [8] Kang, S.W., Shin, Y.J., Shim, Y.J., Jeong, S.Y. and Park, I.S. (2005) Clusterin Interacts with SCLIP (SCG10-Like Protein) and Promotes Neurite Outgrowth of PC12 Cells. *Experimental Cell Research*, **309**, 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.06.012>
- [9] May, P.C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S.A., Poirier, J. and Masters, J.N. (1990) Dynamics of Gene Expression for a Hippocampal Glycoprotein Elevated in Alzheimer's Disease and in Response to Experimental Lesions in Rat. *Neuron*, **5**, 831-839. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90342-D](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90342-D)
- [10] Schrijvers, E.M., Koudstaal, P.J., Hofman, A. and Breteler, M.M. (2011) Plasma Clusterin and the Risk of Alzheimer Disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, **305**, 1322-1326. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.381>
- [11] Yan, D., Yao, J., Liu, Y., *et al.* (2018) Tau Hyperphosphorylation and P-CREB Reduction Areinvolved in Acrylamide-Induced Spatial Memory Impairment: Suppression by Curcumin. *Brain, Behavior, and Immunity*, **71**, 66-80. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.04.014>
- [12] Fernández-Nogales, M., Cabrera, J.R., Santos-Galindo, M., *et al.* (2014) Huntington's Disease Is a Four-Repeat Tauopathy with Tau Nuclear Rods. *Nature Medicine*, **20**, 881-885. <https://doi.org/10.1038/nm.3617>
- [13] Stepan, J., Dine, J. and Eder, M. (2015) Functional Optical Probing of the Hippocampal Trisynaptic Circuit *in Vitro*: Network Dynamics, Filter Properties, and Polysynaptic Induction of CA1 LTP. *Frontiers in Neuroscience*, **9**, Article 160. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00160>
- [14] Garey, J. and Paule, M.G. (2010) Effects of Chronic Oral Acrylamide Exposure on Incremental Repeated Acquisition (Learning) Task Performance in Fischer 34rats. *Neurotoxicology and Teratology*, **32**, 220-225. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.10.001>
- [15] Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.M., *et al.* (2002) Specific Tau Phosphorylation Sites Correlate with Severity of Neuronal Cytopathology in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathologica*, **103**, 26-35. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>
- [16] Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., *et al.* (2011) Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **1**, A006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- [17] Caberlotto, L., Lauria, M., Nguyen, T.P., *et al.* (2013) The Central Role of AMP-Kinase and Energy Homeostasis Impairment in Alzheimer's Disease: A Multifactor Network Analysis. *PLOS ONE*, **8**, e78919. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078919>