

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**FACTORES IMPLICADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN Y
EL AUMENTO DE A β OLIGOMÉRICO SOLUBLE DURANTE
EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO EN UN MODELO
PS1_{M146L}XAPP_{SL} DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

**Memoria presentada por el Ldo. Manuel Torres Canalejo para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Sevilla.**

Sevilla, Mayo de 2011



Dr. **Javier Vitorica Ferrández**, Catedrático de Universidad, y Dra. **M^a Luisa Vizquete Chacón**, Profesora Titular de Universidad. Ambos asociados al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla.

INFORMAN:

Que D. Manuel Torres Canalejo ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral titulada: **FACTORES IMPLICADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN Y EL AUMENTO DE A β OLIGOMÉRICO SOLUBLE DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO EN UN MODELO PS1_{M146L}XAPP_{SL} DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**. Considerando que constituye trabajo de tesis doctoral, autorizamos su presentación para optar al grado de Doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Sevilla, a 11 de Mayo de 2011.

Fdo. Dr. Javier Vitorica

Fdo. Dra. M^a Luisa Vizquete



Dr. Martiniano Santiago Pavón, Catedrático de Escuela Universitaria y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla,

INFORMA:

Que D. Manuel Torres Canalejo, ha realizado bajo el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral bajo la dirección del Dr. Fco. Javier Vitorica Ferrández y la Dra. Maria Luisa Vizquete Chacón en los laboratorios del Departamento Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Sevilla, a 11 de Mayo de 2011.

Fdo. Dr. Martiniano Santiago Pavón

A mi Familia.

A todos los que se consideran parte de ella.

AGRADECIMIENTOS

Hace ya mucho tiempo de la primera vez que llegue al laboratorio, cuando todavía estudiaba la carrera. Entusiasmado por las palabras que escuchaba de la que hoy es una de mis directoras de tesis, no tarde nada en subirme al laboratorio para saber más sobre lo que allí hacían. ¿Cómo iba yo a pensar que allí pasaría varios años de mi vida, rodeado de gente tan estupenda? Ahora que llega la parte la final de este periodo, es hora de dar gracias a todos los que de un modo otro, incluso sin quererlo, me han traído hasta este momento.

En primer lugar, debo agradecer al Dr. Vitorica la oportunidad que me brindó para realizar mi tesis doctoral en su grupo de investigación y bajo su supervisión, así como la formación recibida durante todos estos años.

En segundo lugar, quiero agradecer a Javier su ayuda en todo lo que he necesitado, sus ánimos en las horas bajas, sus regañinas cuando he metido pata, sus palabras de aliento cuando las necesité, sus consejos cuando me sentí perdido, y sobre todo, todo lo que me he aprendido junto a él. Para mí, él es mucho más que un director de tesis.

También deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la persona que me trajo al laboratorio la primera vez, Marisa, mi directora de tesis. A ella le agradezco el tiempo que me ha dedicado durante estos años, y su enorme trabajo ayudándome en las correcciones de la tesis.

A Cristina, mi compañera durante todo este tiempo. Juntos hemos pasado por todo y por todos los estados emocionales que una persona (cuerda) podría soportar. Siempre te estaré agradecido por acompañarme en el laboratorio, y darme el último empujón a la hora de tomar la decisión de decantarme por esta carrera. Eres una persona fenomenal, un ejemplo de coraje y perseverancia,... y al final te has “sacado” el carné de la moto... que grande eres!. Como ya sabes, te considero una gran amiga, con la que sé que puedo contar incondicionalmente.

A Sebastián, mi eterno amigo/compañero, que según nos pille el día igual te quiero que no te quiero. No tengo las palabras adecuadas para expresarte mi agradecimiento por tu apoyo, no solo profesional que es mucho como bien tu sabes, sino aun más importante, también en lo personal. Difícilmente podría encontrar a alguien mejor que tú para el día a día, contigo a lado todo parece más fácil. Te voy a echar mucho de menos cuando ya no esté...

A mi Vicky (a mi hija), insisto en que me llames papá!!, después de todo, lo único que le falta a nuestra relación en un vínculo de consanguinidad. Sin clave de broma, quiero agradecerte toda tu ayuda con mis experimentos, una vez que yo empecé a dedicar menos tiempo al laboratorio, y más a escribir. Realmente te aprecio mucho, porque tu entusiasmo me recuerda cuando yo empecé. Animo, aprende mucho, y disfruta de estos años.

A Luisa, te agradezco tu ayuda, que he encontrado siempre que la he necesitado. Eres una persona que siempre está dispuesta a echar una mano, y eso es admirable. También quiero agradecerte los buenos ratos y las risas juntos, que hacen el trabajo más fácil.

A Elena, quiero agradecerle su forma de ser, siempre agradable y simpática. Me gustan mucho tus preguntas sin fin, que me hacen recordar cosas que creía olvidadas. Eres un personaje. Animo, que llega tu recta final, y pronto estarás defendiendo tu tesis.

A Diego y a la guapísima Angélica les agradezco su apoyo y la ayuda prestada durante todo este tiempo. Eh Diego!, ¿quién nos iba a decir que sin ningún punto en el carnet de alumno interno, y con mi perfil de vendedor de coches, iba a llegar hasta aquí? Hemos pasado buenos ratos juntos y os aprecio mucho a los dos; aunque no nos engañemos, Diego sin Angélica cerca pierde mucho, ella tiene el toque de glamour.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación de la Dra. Antonia Gutiérrez les agradezco su colaboración y el aporte a este trabajo. Sin duda, no sería lo mismo sin las evidencias reportadas por ellos. A David quiero agradecerle su ayuda durante mi estancia en Paris, pues sus protocolos y presentaciones fueron muy útiles durante para mi trabajo allí. A Raquel quiero agradecerle su ayuda por los favores que le he pedido en algunas ocasiones, y por estar siempre disponible.

A mi magnífico Bruno le agradezco todo el tiempo que hemos pasado en el lab y fuera del mismo, los chistes y las risas, aunque no sus discusiones sin fin que me llevan a replantearme si el toro que mató a Manolete pesa realmente 1500 Kg. Si no fuera por San Google me convencerías de todas tus maquinaciones. Estas muy loco, pero te aprecio muchísimo, eres un cacho de pan, y un tío estupendo. Animo con tu DEA, tú puedes con todo.

A Parrado, a Manila y a Dani, porque lo hemos pasado bien entre experimento y experimento, y porque es estupendo tener gente como vosotros cerca.

A Juan Bautista y a Mari Mar por su ayuda con los geles nativos y por aguantarme en su laboratorio. A Juan por sus sabios y oportunos consejos y Mari Mar, porque es muy agradable pararse a charlar con ella cinco minutos. Me transmites paz interior, que en mi laboratorio no sobra, y en el de Parrado tampoco.

También quiero acordarme de otros compañeros del laboratorio que ya no están como Juan Carlos, Blanca y Pepe, con los que empecé a trabajar en el laboratorio. De Sandro, el primero que conocí en una región a priori *non-grata* del departamento, y hoy en día un amigo, así como de muchos otros buenos compañeros de aquel lado como María Jose, Raquel, Ana, Manolo, Rocio, Ruth, Mario, Jose Luis, Antonio y Marti. Todos ellos una personas estupendas, que me han echado un cable cuando lo he necesitado.

De mi estancia en Paris quiero dar las gracias al Dr. Jesus Benavides por aceptarme en Sanofi-Aventis. Quiero agradecer a la Dra. Souad Naimi y a la Dra. Ana Merino-Trigo su ayuda durante mi estancia allí, que me sirvió para madurar profesionalmente y aprender nuevas técnicas. También quiero acordarme de otros compañeros como Jaqueline, Al-Hassan y Sylvie por su ayuda en inmuno y micro disección laser. *Merci beaucoup a tous pour votre aide et patience avec moi.* También deseo acordarme de los amigos que hice en la *Cité Universitaire* como Jose Vicente, Anna, Paco, Manuel y Rocio, con los que he pasado buenos ratos.

De mi estancia en Leuven, quiero dar las gracias al Prof. Dr. Bart De Strooper por aceptarme en su grupo, donde he tenido la oportunidad de conocer técnicas que se utilizan en este trabajo y unos compañeros fantásticos. Quiero acordarme especialmente de Xavi por su ayuda durante mi estancia, y porque con él he aprendido mucho discutiendo sobre ciencia. También quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Amantha Tatiah por su ayuda con la transfección con Adenovirus. A la Dra Lucia Chavez por interesantes discusiones sobre gamma-secretasa de las que he aprendido mucho. Al Dr. Zeljko Svedruzic por su ayuda con los geles de urea. Quiero agradecer a otros buenos compañeros como Hugo, Alí, Vanessa, Lujia, Leen, Smaragda, Lutgarde, Susann, Peter, Samer, Anna, Katleen y Hilde su ayuda en el lab y los buenos ratos cuando hemos salido a pasarlo bien. También quiero acordarme de otros amigos como Máxima, con la se hizo mucho más llevadera la estancia en la residencia del *father Omer*.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, y a los amigos que se han interesado, su apoyo durante la escritura de la tesis, especialmente a mi novia Ana, en quien siempre he encontrado una persona en la que apoyarme y con quien compartir mi situación en los buenos y malos momentos.

*Conserva siempre en tu alma la idea de Ítaca
llegar allí, he aquí tu destino.
Mas no hagas con prisas tu camino;
mejor será que dure muchos años,
y que llegues, ya viejo, a la pequeña isla,
rico de cuanto habrás ganado en el camino.*

Konstantínos Kaváfis ÍTACA

- Sebastian Jimenez, David Baglietto-Vargas, Cristina Caballero, Ines Moreno-Gonzalez, **Manuel Torres**, Raquel Sanchez-Varo, Ruano Diego, M. Luisa Vizuetete, and Antonia Gutierrez y Javier Vitorica.(2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* 5; 28(45):11650-61.
- M. Paz Gavilán, Angélica Castaño, **Manuel Torres**, Manuel Portavella, Cristina Caballero, Sebastián Jiménez, Ana García-Martínez, Juan Parrado, Javier Vitorica, Diego Ruano (2008). Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. *J Neurochem.* 19 (108): 260-272.
- Ines Moreno-Gonzalez, David Baglietto-Vargas, Raquel Sanchez-Varo, Sebastián Jiménez, Laura Trujillo-Estrada, Elisabeth Sanchez-Mejias, Juan Carlos del Rio, **Manuel Torres**, Manuel Romero-Acebal, Diego Ruano, Marisa Vizuetete, Javier Vitorica and Antonia Gutierrez. (2009) Extracellular amyloid-Beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in Young PS1^{M146L}/APP^{751SL} mice. *J Alzheimers Dis.* 18(4):755-76.
- **Manuel Torres***, Rafael Fernandez-Montesinos*, David Baglietto-Vargas, Antonia Gutierrez, Ilana Gozes, Javier Vitorica, David Pozo (2010). Activity-Dependent Neuroprotective Protein (ADNP) Expression in the Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Mol Neurosci.* 2010 May;41(1):114-20.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, **Torres M**, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuetete M, Vitorica J, Gutierrez A (2010). Calretinin Interneurons are Early Targets of Extracellular Amyloid-beta Pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer Mice Hippocampus. *J Alzheimers Dis.* 21(1): 119-1132.
- **Manuel Torres***, Sebastian Jimenez*, Marisa Vizuetete, Raquel Sanchez-Varo, Elisabeth Sanchez-Mejías, Laura Trujillo-Estrada, Irene Carmona, Cristina Caballero, Diego Ruano, Antonia Gutierrez y Javier Vitorica (2011). Age-dependent accumulation of soluble Abeta oligomers reverses the neuroprotective effect of sAPPalpha by modulating PI3K/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mice model. *Journal of Biological Chemistry.* *J Biol Chem.* (En prensa).

* Contribución por igual al trabajo.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

“Establecimiento de un modelo in vivo para el desarrollo de fármacos contra la enfermedad de Alzheimer”, financiado por: *Ministerio de Ciencia y Tecnología, desde Agosto-2003 hasta Marzo-2005. Investigador principal: Dr. Javier Vitorica Ferrández.*

“Mecanismos moleculares y celulares implicados en los procesos neurodegenerativos durante el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer”, financiado por: *Junta de Andalucía, desde Enero-2006 hasta Diciembre-2008. Investigador principal: Dr. Javier Vitorica Ferrández.*

“Mecanismos de señalización de la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Alzheimer: Control de la actividad microglial como estrategia terapéutica neuroprotectora”, financiado por: *Fondo de Investigación Sanitaria; Instituto de Salud Carlos III, desde Enero-2010 hasta Diciembre-2012. Investigador principal: Dr. Javier Vitorica Ferrández.*

“Control de la diferenciación microglial como posible estrategia terapéutica en la enfermedad de Alzheimer”, financiado por: *Junta de Andalucía, desde Febrero-2010 hasta Febrero-2013. Investigador principal: Dr. Javier Vitorica Ferrández.*

“Activación glial en el proceso neuroinflamatorio: una potencial diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer”, financiado por: *Centro de investigación biomédica en red sobre enfermedades neurodegenerativas CIBERNED (Instituto de Salud Carlos III), desde Agosto-2010 hasta Julio-2012. Investigador principal: Dr. Javier Vitorica Ferrández.*

INDICE DE TESIS

A. SUMMARY (ENGLISH)	1
B. INTRODUCCIÓN	7
1. Antecedentes	7
2. Rasgos neuropatológicos de la Enfermedad de Alzheimer.	8
2.1 Placas de β -amiloide ($A\beta$).	9
2.2 Ovillos neurofibrilares.	10
2.3 Disminución de la densidad sináptica.	11
2.4 Pérdida neuronal.	12
3. Tipos de Alzheimer	13
3.1 Alzheimer Familiar.	13
3.1.1 Mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide.	14
3.1.2 Mutaciones en los genes de la presenilina 1 y la presenilina 2.	15
3.2 Alzheimer esporádico.	17
3.2.1 Gen de la proteína ApoE.	18
3.2.2 Factores de riesgo no genéticos.	18
4. Procesamiento de la proteína APP y generación del péptido β -amiloide	19
4.1 Procesamiento β -secretasa y BACE-1	22
4.2 Procesamiento γ -secretasa y presenilinas	24
4.3 Enzimas implicadas en la degradación del Abeta.	25
5. Hipótesis de la cascada amiloide	26
6. Modelos transgénicos empelados en el estudio de la AD.	28
6.1 El doble transgénico PS1xAPP como modelo animal de la AD.	30
7. Señalización mediada por el eje PI3K-AKT-GSK-3 β	34
8. Transporte axonal a través de microtúbulos	36
9. Ruta autofágica.	40
C. OBJETIVOS DEL TRABAJO	47
D. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Animales de experimentación.	49
2. Disección de los centros cerebrales de interés.	49
3. Aislamiento de RNA y proteínas a partir de centros de cerebro.	50
4. Retrotranscripción.	53
5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.	55
6. Obtención de proteínas solubles y preparación de membranas.	66
7. Solubilización secuencial de proteínas de membrana.	67
8. Discriminación de proteínas presentes en dominios de membrana resistentes a la solubilización por detergentes (Rafts lipídicos)	68
9. Obtención/fraccionamiento de muestras en gradientes de densidad.	71
9.1 Aislamiento de sinaptosomas de ratón en gradientes de ficoll PM400.	71

ÍNDICE DEL CONTENIDO

9.2 Fraccionamiento del contenido microsomal en gradientes de Iodixanol (Optiprep®).	74
9.3 Obtención de una fracción enriquecida en vesículas autofágicas en gradiente de ficoll PM400.	78
10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.	80
11. Separación de las isoformas del péptido amiloide en geles de poliacrilamida-SDS-UREA.	82
12. Western-blot (WB).	85
13. Dot-blot (DB).	89
14. ELISA.	89
15. Inmuno-precipitación de las formas oligoméricas del péptido amiloide.	90
16. Determinación del colesterol total en preparaciones de membranas.	92
17. Ensayo de actividad enzimática β -secretasa.	94
18. Ensayo de actividad enzimática γ -secretasa	96
19. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de campo claro.	98
20. Doble marcaje inmunohistoquímico para microscopía de fluorescencia.	101
21. Microscopia electrónica.	102
22. Cultivos de líneas celulares.	102
22.1 Neuroblastomas murinos N2a	103
22.2 Fibroblastos de embriones murinos MEF.	103
23. Método de cuantificación de proteínas (Método de Lowry).	103
24. Análisis estadístico.	104
E. RESULTADOS	105
1. La concentración de formas oligoméricas solubles extracelulares del péptido β -amiloide aumenta durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP.	105
2. Efecto del péptido A β extracelular soluble en la modulación de la vía PI3K-AKT-GSK-3 β en los animales PS1xAPP.	112
2.1 La fosforilación en Ser-9 de GSK-3 β está disminuida durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP.	112
2.2 El péptido APP α soluble y oligómeros solubles de A β presentes en las fracciones S1 de los animales PS1xAPP pueden modular la fosforilación de GSK-3 β en cultivos de células N2a	115
3. Estudio de la proteína precursora del amiloide (APP) durante el proceso de envejecimiento de los animales PS1xAPP.	120
3.1 Expresión y procesamiento de la proteína precursora del β -amiloide (APP) en los animales PS1xAPP durante el envejecimiento.	120
3.2 Estudio de la actividad secretasa implicada en la producción del β -amiloide.	125
3.2.1 La actividad β - y γ -secretasa están aumentadas en los animales	125

viejos PS1xAPP.	
3.2.2 La presencia de BACE-1 y PS1 está aumentada en los animales PS1xAPP durante el envejecimiento.	128
3.3 Implicación de los Rafts lipídicos o Dominios de membrana resistentes a detergentes en la producción del péptido A β en los animales viejos PS1xAPP.	134
3.3.1 Análisis de los dominios de membrana resistentes a detergentes (DRMs) en gradientes de sacarosa en los animales PS1xAPP.	134
3.3.2 La solubilización de APP y C99 cambia durante el proceso de envejecimiento en los animales PS1xAPP.	138
4. Implicación de la ruta autofágica en la producción de A β durante el envejecimiento en los ratones PS1xAPP.	143
4.1 La razón BAG-3/BAG-1 está incrementada en los animales viejos PS1xAPP.	143
4.2 La presencia de la proteína LC3-II está incrementada en el hipocampo de los animales viejos PS1xAPP.	144
4.3 Estudio de las alteraciones del transporte axonal como posible causa de la acumulación de vesículas en los animales PS1xAPP.	148
4.3.1 Evidencias bioquímicas ponen de manifiesto alteraciones en los sistemas de transporte axonal en los animales PS1xAPP.	149
4.3.2 Consecuencias de la disfunción del transporte axonal en el procesamiento de la proteína APP en los animales PS1xAPP.	155
4.4 APP y APP-CTFs se localizan en vesículas autofágicas en los animales PS1xAPP de 18 meses.	158
4.4.1 La maduración de la subunidad V0a1 de la bomba de protones vesicular está impedida durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP.	164
4.4.2 El fallo en la acidificación de las vesículas en una línea celular de neuroblastomas lleva a la acumulación de APP-CTFs y de PS1-CTF.	167
4.5 Los sinaptosomas de los animales viejos PS1xAPP contienen A β monomérico y formas oligoméricas en baja concentración.	169
5. Estudio del péptido A β presente en los depósitos de extracelulares de A β como posible fuente de oligómeros solubles en los animales PS1xAPP.	176
F. DISCUSIÓN	181
1. Efecto neurotóxico de las formas oligoméricas solubles del péptido A β .	181
2. Caracterización de las formas solubles de A β oligomérico en el modelo PS1 _{M146L} XAPP _{751-SL} .	186
3. Mecanismos moleculares y celulares implicados en el aumento de A β oligomérico asociado al envejecimiento.	191

ÍNDICE DEL CONTENIDO

4. Acumulación de A β intracelular como posible origen de las formas oligoméricas solubles extracelulares.	198
5. Implicaciones de los resultados obtenidos en el modelo trasngénico PS1 _{M146L} XAPP _{751-SL} en la patología humana.	201
G. CONCLUSIONS (ENGLISH)	205
H. BIBLIOGRAFÍA	207

B. INTRODUCCIÓN

Figura I1. Secuencia de aminoácidos de la proteína APP, las mutaciones descritas en AD Familiar y sitios de procesamiento.	15
Figura I2. Secuencia de aminoácidos de presenilina-1 no procesada (<i>full-length</i>), y mutaciones descritas en la AD Familiar.	17
Figura I3. Procesamiento de la proteína APP y generación del péptido A β .	22
Figura I4. Hipótesis de la cascada amiloide.	27
Figura I5. Esquema representativo de la proteína motora kinesina-1.	37
Figura I6. Tipos de autofagia en mamíferos.	42
Figura I7. Esquema representativo de la formación de los autofagosomas.	45

C. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1. Comprobación de la integridad del RNA en gel de agarosa.	52
Figura M2. Esquema ilustrativo de la unión de los diferentes tipos de cebadores que se pueden utilizar en retrotranscripción a la hebra de RNA.	54
Figura M3. Unión del colorante fluorescente SYBR-green I a la doble hebra de DNA durante las fases de la PCR.	57
Figura M4. Curva de disociación de dos productos de PCR diferentes para la misma diana.	59
Figura M5. Esquema representativo del funcionamiento de las sondas Taqman.	60
Figura M6. Curvas de amplificación para los genes somatostatina y GAPDH.	63
Figura M7. Análisis de flotilina-1 en gradientes de sacarosa tras solubilización empleando diversos detergentes.	70
Figura M8. Análisis de caveolina-2 en gradientes de sacarosa tras solubilización empleando diversos detergentes.	71
Figura M9. Presencia de la enzima ATP-sintetasa- β en la fracción micro- y sinaptosomal.	73
Figura M10. Densidad versus concentración de ficoll PM400.	74
Figura M11. Relación de la densidad e índice de refracción con la concentración de iodixanol.	76
Figura M12. Representación de la concentración de iodixanol calculada y el porcentaje de LC3-II detectado en fracciones de gradiente de iodixanol para N2a.	78
Figura M13. LC3-II cambia de fracción en función de la velocidad de centrifugación.	80
Figura M14. Movilidad electroforética de los péptidos A β 1-38; 1-40; 1-42 y 1-46 en un gel de urea.	83
Figura M15. Conjunto de reacciones acopladas empeladas para la detección del colesterol en muestras biológicas.	92
Figura M16. Curva patrón de colesterol.	93
Figura M17. Puesta a punto del ensayo de actividad enzimática γ -secretasa.	97
Tabla M1. Programa para la purificación de RNA empleando el sistema <i>ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems)</i> .	52
Tabla M2. Relación de los reactivos suministrados por <i>Applied Biosystems</i> y concentración final de los mismos para la reacción de retrotranscripción.	54
Tabla M3. Relación de las parejas de cebadores empleadas en el desarrollo de este trabajo.	58
Tabla M4. Relación de las Sondas Taqman empleadas en el desarrollo de este trabajo.	59
Tabla M5. Relación de los reactivos empelados para la amplificación por	65

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

PCR a tiempo real empleando SYBR-green I.

Tabla M6. Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando Taqman.	65
Tabla M7. Programa predeterminado de amplificación para PCR a tiempo real.	66
Tabla M8. Marcadores empleados en la detección de orgánulos celulares.	75
Tabla M9. Índice de refracción, densidad y concentración de iodoxanol en fracciones de un gradiente de iodoxanol en células N2a.	77
Tabla M10. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS.	81
Tabla M11. Secuencia aminoacídica de los péptidos A β de diferentes longitudes.	84
Tabla M12. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS-UREA.	85
Tabla M13. Relación de anticuerpos empleados en WB, IP y DB, y características más relevantes.	88
Tabla M14. Relación de los anticuerpos empleados en los estudios inmunohistoquímicos desarrollados en este trabajo, así como sus características más relevantes.	101

D. RESULTADOS

Figura R1. Cuantificación del péptido A β soluble y de sus formas oligoméricas en las fracciones S1 de los animales PS1xAPP.	106
Figura R2. Estudio de las fracciones solubles S1 de los animales PS1xAPP mediante WB con el anticuerpo 6E10.	107
Figura R3. Inmunoprecipitación de las formas oligoméricas solubles del péptido A β en animales de 18 meses PS1xAPP.	109
Figura R4. Inmunoprecipitación de oligómeros solubles de A β en animales de 6 y 18 meses PS1 _{M146L} xAPP _{751-SL} y PS1 Δ _{exon9} xAPP _{695-S} .	111
Figura R5. Estudio de la fosforilación en Ser-9 de GSK-3 β en animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses.	114
Figura R6. Efecto de las fracciones S1 de animales WT y PS1xAPP sobre la fosforilación de GSK-3 β en cultivos de N2a.	116
Figura R7. Efecto de las fracciones S1 de animales PS1xAPP inmunodepletadas con 6E10 o A11 sobre la fosforilación de GSK-3 β en cultivos de N2a.	119
Figura R8. Expresión de mRNA de APP endógena y transgénica en el hipocampo de animales PS1xAPP.	121
Figura R9. Estudio de la proteína APP y fragmentos C-terminales en el hipocampo de animales PS1xAPP.	123
Figura R10. Relación fragmento C-terminal / APP en animales PS1xAPP durante el envejecimiento.	126
Figura R11. Actividad β -secretasa en la corteza de animales PS1xAPP.	126
Figura R12. Actividad γ -secretasa en la corteza de animales PS1xAPP.	128
Figura R13. Expresión de mRNA de BACE-1 en el hipocampo de animales WT y PS1xAPP.	129
Figura R14. Estudio de BACE-1 mediante WB en el hipocampo de animales PS1xAPP y WT	130
Figura R15. Expresión transcripcional de PS1 endógena y transgénica en el hipocampo de los animales PS1xAPP.	132
Figura R16. Estudio de PS1 y de los correspondientes fragmento C-terminales en el hipocampo de animales PS1xAPP.	133

Figura R17. Determinación del colesterol total en membranas de corteza de animales WT y PS1xAPP.	135
Figura R18. Estudio de flotilina-1 y caveolina-2 en los dominios de membrana resistentes a la solubilización por detergentes (Rafts lipídicos) en animales PS1xAPP.	136
Figura R19. Estudio de APP-FL y APP-CTFs en los dominios de membrana resistentes a la solubilización por detergentes (Rafts lipídicos) en animales PS1xAPP.	137
Figura R20. Distribución del colesterol total en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP.	139
Figura R21. Estudio de los precursores del β -amiloide en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP.	140
Figura R22. Estudio de los marcadores de Rafts lipídicos y ATP-sintetasa β en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP.	141
Figura R23. Estudio de BACE-1 y PS1 en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP.	142
Figura R24. Expresión de mRNA de de BAG-3 con respecto a BAG-1 en el hipocampo de los animales WT y PS1xAPP.	144
Figura R25. Estudio de la acumulación de vesículas autofágicas en el hipocampo de los animales PS1xAPP.	146
Figura R26. Expresión de mRNA de beclina-1 en el hipocampo de los animales WT y PS1xAPP.	148
Figura R27. Las distrofias neuríticas que rodean las placas de A β son positivas para neurofilamento y sinaptofisina	149
Figura R28. Estudio de la fosforilación de la proteína tau en el hipocampo de los animales PS1xAPP.	151
Figura R29. Estudio mediante WB de la cadena pesada de kinesina-1 en animales WT y PS1xAPP.	153
Figura R30. Estudio de la fosforilación de los neurofilamentos en el hipocampo de animales WT y PS1xAPP.	154
Figura R31. Fraccionamiento entre micro- y sinaptosomas del contenido de membranas en animales PS1xAPP.	156
Figura R32. Fraccionamiento del contenido vesicular microsomal en gradiente de iodoxanol en animales PS1xAPP viejos.	160
Figura R33. Inmunotinción para APP-FL/APP-CTFs visualizada con microscopía electrónica.	162
Figura R34. Aislamiento de una fracción enriquecida en vesículas autofágicas en animales PS1xAPP.	163
Figura R35. Estudio de la subunidad V0a1 de la bomba de protones vesicular en el hipocampo de animales WT y PS1xAPP.	166
Figura R36. Estudio de los efectos de la cloroquina sobre el aclaramiento de los precursores de A β en cultivos de N2a.	168
Figura R37. Estudio de la posible contaminación por A β extracelular en preparaciones de sinaptosomas.	171
Figura R38. Estudio del péptido β -amiloide en sinaptosomas de corteza de animales PS1xAPP.	172
Figura R39. Inmunoprecipitación de formas oligoméricas de A β contenidas en sinaptosomas en animales PS1xAPP.	174
Figura R40. Presencia de formas oligoméricas de alto peso molecular en placas de A β .	178

A. SUMMARY (ENGLISH)

Ph.D. Thesis title:

Factors involved in neurodegeneration and increase of soluble A β oligomers during the aging process of a PS1_{M146L}xAPP_{751-SL} model of Alzheimer's Disease.

Ph.D. Student:

Manuel Torres Canalejo. Pharmacy degree. University of Seville.

Ph.D. Supervisors:

Prof. Dr. Fco. Javier Vitorica Ferrández.

Professor of Biochemistry and Molecular Biology. University of Seville.

Dr. M^a Luisa Vizquete Chacón

Associated Professor of Biochemistry and Molecular Biology. University of Seville.

Contact information:

Emails: mtorres@us.es; vitorica@us.es; mvizquete@us.es.

Department of Biochemistry and Molecular Biology.

Faculty of Pharmacy, University of Seville.

Profesor Garcia Gonzalez 2

41012 Seville (Spain)

Ph.D.thesis brief summary.

We were characterizing a transgenic (tg) mouse model of Alzheimer's Disease (AD). This model express two human proteins implicated in Familiar Alzheimer Disease (FAD): the amyloid precursor protein (APP₇₅₁) that harbors the mutations *Swedish* and *London*; and presenilin-1 harboring the M146L mutation.

This work was principally focus on hippocampus, although some fractionation protocols and synaptosomes preparation required a relatively high quantity of fresh tissue and we used cortex.

In this work, we have reported the existence of an age-dependent increase of extracellular soluble A β oligomers in these mice. Since soluble A β oligomeric species could constitute the neurotoxic agent in AD (Haass and Selkoe, 2007), we have characterized the A β oligomers, present in our tg mice, using antibodies against A β conformational epitopes (Kayed et al., 2007; Lambert et al., 2007). Using 6E10 in immunoprecipitation and western-blot (WB) analysis of precipitates we identified the presence of A β oligomers in a wide range of molecular weight: 24; 47, 57, 90 and 96 KDa. The calculated molecular weights were compatible with 6-, 10-, 12-, 20- and 22-mer oligomers. These same oligomeric Abeta forms were also identified using a different PS1xAPP model (from Jackson) although at a much lower concentration. In this context, similar A β oligomers, nonamers and dodecamers, have been previously reported in AD brain tissue soluble extracts (Gong et al., 2003) and in Tg2576 mice (Lesné et al., 2006).

We have previously demonstrated the active implication of these soluble oligomers in the activation of microglia towards a classic (cytotoxic) phenotype (Jimenez et al., 2008). In the present work, we investigated the possible role of these A β species as modulators of GSK-3 β activation. In fact, our data demonstrated that these naturally secreted oligomers displayed a negative modulation on the prosurvival AKT-GSK-3 β pathway. Using N2a cells, as an *in vitro* system, we demonstrated that soluble APP α and A β oligomers are able to modulate (positive and negative, respectively) the PI3K/Akt/GSK3 β phosphorylation, through at least IGF1 and/or insulin receptors. Thus, we concluded that sAPP α in the soluble fractions stimulated whereas A β oligomers blocked the pro-survival signaling during the aging process in our PS1xAPP mice.

SUMMARY

As a second objective, we investigated the age-dependent factors involved in the apparition and increase of these oligomeric species in our aged tg mice. In this sense, our first hypothesis was that the APP processing could be affected during aging in our PS1xAPP animals. In this way, if the amyloidogenic route was stimulated during aging, the increase in A β concentration could mediate the apparition of A β oligomers. For this reason, we studied the expression of APP and the protein accumulation of APP and APP C-terminal fragments (APP-CTFs). As expected, the expression of transgenic APP displayed no age-associated changes. However, we found a strong age-dependent accumulation of both APP and APP C-terminal fragments (CTFs). Interestingly, not only A β precursors but also PS1-CTF (part of gamma-secretase) and BACE-1 (beta-secretase) accumulated during aging in PS1xAPP animals. According with these data, we also found an increase in both β - and γ -secretase activities in aged animals.

At this point, our results demonstrated that the secretase activities implicated in the production of β -amyloid were increased in aged PS1xAPP animals. However, the reasons underlying the accumulation of A β precursors were still unknown. Additional experiments designed to solubilize total membrane proteins in a battery of detergents (from soft to extreme conditions) demonstrated that APP, APP-CTFs, PS1-CTF and BACE-1 accumulated, almost exclusively, in a fraction relatively resistant to soft detergents. Interestingly, LC3-II, an autophagic vesicle marker, also accumulated in the same fraction, suggesting that all these insoluble proteins might be accumulated in autophagic vesicles (AVs). In this context, we thus investigated the possible AVs accumulation in our aged animals. In fact, we found an age-dependent increase of LC3-II in PS1xAPP animals. These results suggested a possible connection between the accumulation of APP and APP-CTFs with the autophagic route. These data were also corroborated by immunohistochemistry and electron microscopy.

Taking into account that accumulation of vesicles has been previously described in our mouse model in dystrophic neurites surrounding amyloid plaques (Boutajangout et al., 2004), we speculated that deficiencies associated with the axonal transport might be implicated in accumulation of AVs. In fact, the kinesin-1 motor protein, the phosphorylation level of microtubule associated protein tau and the integrity of the non-phosphorylated neurofilament seemed to be affected. Our results showed that kinesin-1 heavy chain was partly degraded in aged PS1xAPP animals. Concomitantly, phospho-tau (AT8 and AT100 epitopes) was accumulated in dystrophic neurites. Finally, degradation of non-phosphorylated neurofilament was patent in aged

PS1xAPP animals, leading to an increase in phospho/non-phospho ratio that could be implicated in cytoskeleton abnormalities.

As expected, the possible age-dependent axonal transport dysfunction was reflected by vesicle trafficking abnormalities in our PS1xAPP animals. In this sense, LC3-II was anomaly accumulated in synaptosomes (isolated synaptic terminals), coincident with a high accumulation of monomeric A β , in aged tg mice. In contrast, APP-CTFs were located preferentially in microsomes, suggesting that vesicles presented in different regions (soma and synapses) accumulated mainly precursors or β -amyloid respectively. Thus, these results strongly indicated the existence of vesicle trafficking problems associated to the age of PS1xAPP animals. In addition, these problems on transport apparently affected APP processing leading to the accumulation of monomeric A β in synaptosomes from aged tg mice.

Co-localization of APP and APP-CTFs in accumulated AVs were supported by results obtained from microsomal vesicle fractionation in density gradients and specific protocols for AV isolation (Yang et al., 2009). Although accumulation of vesicles and altered axonal transport could explain the observed APP and APP-CTFs accumulation, we also speculate that additional deficiencies in lysosomal degradation might be implicated in these effects. In this sense, it has been reported the possible implication of PS1 mutations in impaired maturation of V0a1 subunit of the vacuolar proton pump in vitro (Lee et al., 2010; Neely et al., 2011). However, we have not observed such impaired maturation in our tg model. We only observed a decrease in total mature form of V0a1 in aged PS1xAPP mice, as compared with 6-month-old tgs. This result suggested that lysosomal degradation should be just less efficient in aged animals.

Finally, the possible accumulation of oligomeric A β in synaptosomes was studied by immunoprecipitation assays. Our results clearly showed the presence of relatively high amount of monomeric A β in the isolated terminals, accompanied by a low concentration of A β oligomers. On the contrary, A β analyzed in the corresponding extracellular soluble fractions, from the same aged tg mice, only showed oligomers and not monomers. This discrepancy in the oligomers concentration (from synaptosomes to extracellular fractions) might reflect the different efficiencies of A β clearance mechanism to clear soluble A β from the extracellular space.

In conclusion, results showed in this work let us hypothesize a possible intracellular origin for extracellular A β oligomers in our PS1xAPP mouse model. Indeed the age-related axonal transport deficiencies could induce the accumulation of AVs in

SUMMARY

dystrophic neurites and synaptosomes in aged tg mice. These vesicles highly accumulated APP, APP-CTFs and possibly β -amyloid in an age-dependent manner. Finally accumulation of monomeric β -amyloid in synaptosomes was accompanied by apparition of a low concentration of A β oligomers that could be secreted to the extracellular space where accumulated. On the other hand, we cannot discard other possible origins for soluble A β oligomers, like "leaking" amyloid plaques.

B. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer (AD) fue descrita en 1907 por el neuropatólogo y psiquiatra alemán Aloïs Alzheimer en el artículo titulado “*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*” (“Sobre una enfermedad peculiar de la corteza del cerebro”). El diagnóstico se hizo en una paciente de 55 años (Auguste Deter) que murió tras sufrir durante cuatro años una pérdida progresiva de memoria, desorientación espacio-temporal, alucinaciones, paranoia, y trastornos de la conducta y del lenguaje. El análisis post-mortem de su cerebro reveló la presencia de depósitos extracelulares (placas) y marañas de fibras intracelulares (ovillos), lesiones histopatológicas que aún hoy se usan como principales marcadores de diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, la denominación como enfermedad de Alzheimer tuvo lugar unos años después, en 1910, por el psiquiatra alemán Emil Kraepelin.

La enfermedad de Alzheimer constituye hoy en día la forma de demencia más común en personas mayores de 65 años y una de las patologías neurodegenerativas más graves en este sector de la población. Los enfermos de AD sufren una pérdida progresiva de memoria y graves trastornos de la personalidad en las etapas iniciales de la patología, además de pérdida de la capacidad cognitiva (afasia, apraxia y agnosia), ansiedad, insomnio, paranoia y demencia en estadios más avanzados. Finalmente, acaban en estado vegetativo y postrados en cama durante los últimos meses, e incluso años, de su vida. En consecuencia, la AD es generalmente una enfermedad incapacitante para el paciente, que habitualmente requiere de ayuda familiar y/o servicios especializados muy costosos económicamente.

Desde un punto de vista epidemiológico, la incidencia de AD esporádico es baja hasta los 60 años de edad (3-4% de la población), aumentando exponencialmente a partir de ese momento, lo que determina a la edad del paciente como el principal factor de riesgo para padecerla. En este sentido, más del 40% de la población de 80 años presenta AD en alguno de sus grados (bajo, moderado, grave, profundo), y de hecho, unas 800.000 personas en nuestro país y unos 15 millones en el mundo sufren actualmente las consecuencias de esta enfermedad. Además, se calcula que alrededor de 100 millones de personas se encontrarán afectadas por esta patología en el mundo en el año 2050 (*World Alzheimer Report 2009*). En consecuencia, la alta incidencia del Alzheimer en individuos de edad avanzada, junto con el aumento progresivo de la expectativa de vida actual, el envejecimiento progresivo de la población en los países desarrollados y los altos costes afectivos y

INTRODUCCIÓN

sanitarios derivados de esta enfermedad, convierten a la enfermedad de Alzheimer en uno de los problemas socio-sanitarios más importantes del momento y del futuro próximo.

Por otra parte, la etiología de esta enfermedad es aún desconocida y tampoco existe actualmente ningún tratamiento farmacológico efectivo para paliar las deficiencias neurológicas que se producen durante la evolución de la misma o, al menos para retrasar la aparición de sus síntomas. A este respecto, el tratamiento sintomático más frecuente consiste en inhibidores de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, el uso de estos inhibidores sólo retrasa parcialmente las deficiencias cognitivas observadas en los pacientes. Además, sólo el 50% de estos enfermos responden al tratamiento, lo que significa que el sistema colinérgico no constituye la diana farmacológica óptima para combatir la sintomatología y/o la progresión de esta enfermedad. En este sentido, un tratamiento eficaz de esta patologías, o incluso de las deficiencias cognitivas del envejecimiento normal, debería evitar o retrasar la muerte neuronal progresiva que acontece en estos procesos. Simplemente un retraso en la aparición de la sintomatología asociada a estos procesos mejoraría significativamente, por un lado, la calidad de vida del paciente y, por otro, reduciría los costes sanitarios y asistenciales.

2. Rasgos neuropatológicos de la Enfermedad de Alzheimer.

Los principales cambios macroscópicos característicos del cerebro de los pacientes de Alzheimer incluyen una importante atrofia cortical, con adelgazamiento de las circunvoluciones, ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, dilatación de las cavidades ventriculares y disminución del peso y volumen cerebral. La atrofia afecta a los lóbulos temporales (más frecuentemente), frontales, parietales y occipitales. El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas y, en menor proporción, puede haber una afectación parieto-occipital.

Estas características neuropatológicos de la AD se manifiestan sólo en determinadas áreas cerebrales vulnerables a esta patología, inicialmente en la corteza entorrinal, progresa hacia el hipocampo, y finalmente afecta a las áreas neocorticales (Braak and Braak, 1991). Cuando se diagnostica clínicamente la AD los cambios neocorticales son ya significativos, lo que supone un problema para la identificación de la enfermedad en estadios tempranos, cuando los cambios neuropatológicos están

limitados a las estructuras del lóbulo temporal medial. Las zonas afectadas por la AD están implicadas en los mecanismos de memoria y aprendizaje. Por el contrario, la corteza motora y sensorial no parecen estar alteradas, permaneciendo intactas las funciones en las que están implicadas incluso en los estadios más avanzados de la enfermedad.

Por otra parte las lesiones microscópicas características de la AD son: la aparición de placas de β -amiloide y ovillos neurofibrilares, la disminución de la densidad sináptica y degeneración neuronal en las áreas cerebrales afectadas.

2.1 Placas de β -amiloide ($A\beta$).

Las placas de β -amiloide son agregados proteicos insolubles que se depositan a nivel extracelular y que están formados principalmente por el péptido $A\beta$ (Glennner and Wong, 1984; Masters et al., 1985), aunque también pueden encontrarse en menor grado otras proteínas inflamatorias, séricas, proteasas, iones metálicos, etc (Atwood et al., 2002). El péptido $A\beta$ contiene de 39-43 aminoácidos y deriva del procesamiento de la proteína precursora del β -amiloide (APP) (De Strooper, 2010). *In vivo* pueden encontrarse dos formas mayoritarias del péptido $A\beta$: $A\beta_{40}$ que termina en el aminoácido Val40, y $A\beta_{42}$ que tiene dos aminoácidos adicionales, Ile41 y Ala42, lo que le confiere mayor hidrofobicidad y capacidad de agregación (Wolfe, 2007). El péptido $A\beta$ se deposita en el espacio extracelular del parénquima cerebral en forma de placas seniles, las cuales se subdividen en neuríticas y difusas, que se diferencian principalmente en la morfología compacta o difusa que presenten, y en la presencia o no de células gliales asociadas (Dickson and Vickers, 2001; Selkoe, 2001; Fiala, 2007).

Las **placas neuríticas** son depósitos extracelulares de aspecto filamentoso formados principalmente por fibrillas de $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$. Asociadas a estas placas aparecen neuritas distróficas y células de microglía reactiva, mientras que la astroglia activada se localiza en la periferia. El tiempo de formación de este tipo de placas es desconocido, ya que pueden formarse gradualmente durante un largo periodo de tiempo, incluso años. Su tamaño oscila entre 10 y 120 μm , mientras que la densidad es muy variable. Algunos autores las subdividen en placas primitivas (esféricas y sin núcleo compacto) que aparecen en zonas cercanas a los axones y las sinapsis, y placas clásicas (núcleo amiloide denso, redondo y compacto y un halo alrededor) que se asocian espacialmente a los vasos sanguíneos.

INTRODUCCIÓN

Las **placas difusas** son depósitos extracelulares no fibrilares, también denominados placas pre-amiloideas. Son zonas difusas o amorfas sin núcleo compacto, con poca o ninguna microglía y astrogliá reactiva y no suelen presentar neuritas distróficas. Suelen aparecer en zonas cercanas a neuronas. Están compuestas por A β 42 y un poco o nada de A β 40.

Los mecanismos subyacentes a la formación de los depósitos de A β son aún una incógnita, aunque se ha atribuido gran importancia a la hidrofobicidad y capacidad de agregación del péptido A β 42 (Chen and Glabe, 2006). De hecho, tanto los enfermos de AD como la mayor parte de los modelos animales empleados en el estudio de esta patología presentan una razón A β 42/40 aumentada y depósitos de A β con respecto a individuos sanos (Kuo et al., 1996; Duff et al., 1996; Wang et al., 2006).

2.2 Ovillos neurofibrilares.

Son agregados intracelulares, formados por filamentos helicoidales emparejados, en los que el componente mayoritario es la proteína tau hiperfosforilada (Goedert et al., 1992). A todas las enfermedades que presentan agregados intracelulares de tau se les denomina taupatías, y se diferencian en la composición y morfología de los filamentos y en su distribución regional dentro del cerebro. Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP: *microtubule associated protein*), cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma 17. Su función es estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto colaborando en la generación y el mantenimiento de las neuritas (Cleveland et al., 1977). Para formar los ovillos, tau se disocia de los microtúbulos, probablemente mediante hiperfosforilación y pasa de tener una localización axonal a somatodendrítica, lugar donde se ensambla en forma de pares de filamentos helicoidales que constituyen las unidades estructurales de los ovillos. Muchos investigadores sugieren que la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer es debida a una alteración en el citoesqueleto, y relacionan la muerte neuronal con la presencia de ovillos neurofibrilares. Al fosforilarse tau y disociarse de los microtúbulos se produciría una pérdida de función de los mismos, con lo que se generan fallos en el transporte axonal y muerte neuronal (Gotz, 2001; Spires-Jones et al., 2009).

La aplicación de métodos estereológicos en cerebros con Alzheimer ha revelado que el número de neuronas perdidas excede al número de neuronas que contienen ovillos, indicando que la pérdida neuronal en la AD podría ser independiente de la formación de ovillos (Morishima-Kawashima and Ihara, 2002). De hecho, a pesar de las anomalías en el citoesqueleto, las neuronas que contienen ovillos pueden

sobrevivir durante años, aunque la persistencia de estas neuronas, per sé, no es una prueba de su integridad funcional. En enfermos de Alzheimer existe un patrón de expansión de los ovillos, desde zonas temporales mediales en dirección al lóbulo temporal y, de ahí, al resto de la corteza cerebral (DeKosky, 2003).

Hay dos tipos de quinasas que modifican a tau, las dirigidas y las no dirigidas por prolina (Morishima-Kawashima et al., 1995). Dentro del primer grupo, la enzima glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3: *Glycogen Synthase Kinase 3*) y la quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5: *cyclin-dependent kinase 5*), también denominadas tau-kinasa I y tau-kinasa II (Ishiguro et al., 1993), tienen un papel relevante en la fosforilación de tau. GSK-3 modifica residuos localizados en las regiones adyacentes al dominio de tau implicado en la unión a microtúbulos. Por otro lado, GSK-3 interacciona con otras proteínas, como la presenilina 1 (PS1), que tienen un papel importante en la iniciación de la patología que se observa en la enfermedad (Anderton, 1999; Ballatore et al., 2007).

La proteína cdk5 también fosforila a tau, hecho que puede facilitar la posterior modificación de tau por GSK3. La fosforilación por cdk5 parece estar regulada por la proteína p35, que en la enfermedad de Alzheimer puede sufrir un procesamiento proteolítico que la desregula y la hace permanecer activa, consiguiendo así fosforilar aberrantemente a tau (Patrick et al., 1999). Es importante resaltar que mutaciones en la proteína tau no dan lugar a Alzheimer, sino a demencia frontotemporal, vinculada probablemente a otras demencias neurodegenerativas como degeneración corticobasal y parálisis supranuclear progresiva (Kar et al., 2005).

2.3 Disminución de la densidad sináptica.

Diferentes grupos de investigación, empleando técnicas convencionales ultraestructurales e inmunocitoquímicas, han demostrado que en la AD se produce una pérdida significativa de densidad sináptica en áreas neocorticales de asociación y en el hipocampo, concretamente en las capas III y V de la corteza de los lóbulos frontal, temporal y parietal, y en la capa granular del giro dentado (Scheff and Price, 2003). Esta disminución de la densidad sináptica es la característica patológica de la enfermedad que mejor correlaciona con el decline cognitivo de la misma.

En este sentido, la plasticidad sináptica definida como la capacidad de formar una sinapsis, proporciona la base para los distintos tipos de memoria y aprendizaje. Dos tipos de plasticidad sináptica son la potenciación (LTP) y la depresión (LTD) a

INTRODUCCIÓN

largo plazo. La pérdida sináptica o su disfunción correlaciona con el grado de demencia, ya que la acumulación de A β está asociada con la pérdida de función sináptica y con la formación de neuritas distróficas y estos cambios sinápticos parecen tener un gran efecto sobre los procesos de memoria y aprendizaje.

La toxicidad mediada por A β disminuye la excitabilidad neuronal porque provoca la internalización de receptores AMPA, lo que genera depresión sináptica y pérdida de espinas dendríticas, provocando la interrupción de la LTP, imprescindible en la plasticidad sináptica asociada con los procesos de memoria y aprendizaje (Small, 2008). Por otro lado, también se ha propuesto que la forma de A β 42 promueve la endocitosis de receptores NMDA, reduciendo su densidad en las sinapsis. A β 42 puede ser secretado en la hendidura sináptica y unirse a los receptores α 7-nicotínicos, provocando la activación de calcineurina, lo que inicia una cascada de señalización que conlleva a la internalización de los receptores NMDA, disminución de su densidad en las sinapsis y de la transmisión glutamatérgica, y fallo en la plasticidad sináptica (Tanzi, 2005).

2.4 Pérdida neuronal.

Estudios neuropatológicos de cerebros de Alzheimer demuestran que en esta enfermedad existe una pérdida severa de neuronas a nivel de:

Corteza entorrinal e hipocampo. En los casos preclínicos de la AD, en los que no existe demencia, aunque ya aparecen las primeras placas amiloides y ovillos neurofibrilares, la región CA1 del hipocampo y la corteza entorrinal no muestran una disminución significativa del número de neuronas (Giannakopoulos et al., 1998). Sin embargo, en la fase intermedia o moderada de la enfermedad, existe un 35% de pérdida neuronal en la corteza entorrinal, siendo un 50% en la capa II (Price et al., 2001). En la fase avanzada, se ha cuantificado una reducción del 32% en la corteza entorrinal, un 57% en la capa II, mientras que las demás capas sufren una pérdida neuronal del 25% (Gomez-Isla et al., 1996), así como un 21% de reducción en el volumen de la corteza entorrinal. En la Capa CA1 del hipocampo se produce una pérdida de neuronas en estadios avanzados, en los que el 60% de neuronas de la capa piramidal de CA1 siguen estando presentes (West et al., 1994; Gunten et al., 2006).

Neuronas piramidales de las de las areas neocorticales de asociación. En los enfermos de AD se ha observado que existe un patrón de afección de la

enfermedad en distintas regiones de la corteza, viéndose afectada en primer lugar la corteza temporal, seguida de la frontal y, finalmente, disminuye la densidad neuronal en la corteza somatosensorial, de tal modo que en estadios tempranos de la enfermedad existe una disminución del 15% de la materia gris de la corteza temporal y parietal de manera bilateral, mientras que regiones como la corteza motora o la sensorial primaria apenas se ven afectadas (<5%). Un año más tarde, las imágenes realizadas en el mismo individuo registraron que la corteza frontal pasaba de tener una pérdida neuronal del 6% a más del 15%, mientras las áreas motoras y sensoriales permanecían sin daños (Thompson et al., 2003). Por lo tanto, el lóbulo temporal es especialmente susceptible a la AD. La vulnerabilidad de estas áreas de asociación neocortical posiblemente se deba a la conexión funcional que tienen con las estructuras límbicas, zona de inicio de la patología.

Finalmente, cabe destacarse que los daños neuronales y sinápticos se observan en el transcurso de la patología como una pérdida de materia gris cerebral en imágenes obtenidas mediante resonancia magnética. Este hecho ha permitido conocer el patrón que sigue la progresión de la enfermedad de Alzheimer mediante el análisis de las imágenes obtenidas en cerebros de pacientes en diferentes etapas de la enfermedad. De esta forma, se ha observado que la evolución de la enfermedad de Alzheimer tiene tres características principales (Thompson et al., 2003):

- Se expande a través del cerebro con una secuencia temporal-frontal-sensomotora. La pérdida de materia gris se observa primero en las regiones temporal y parietal, siendo el hipocampo y la corteza entorrinal las zonas más tempranas y severamente afectadas. Más tarde, el déficit se expande a la corteza temporal y frontal, y finalmente, a cortezas sensomotora y visual.
- El hemisferio cerebral izquierdo pierde sustancia gris más rápidamente que el derecho, consistente con una afectación más severa de este hemisferio en el Alzheimer.
- Hay regiones cerebrales, como la corteza sensomotora, donde no aparece daño hasta muy avanzada la enfermedad

3. Tipos de Alzheimer

3.1 Alzheimer Familiar

Este tipo de Alzheimer (presenil o de inicio temprano) se caracteriza por su aparición entre los 35 y 40 años de edad (Rosenberg, 2000), y es debido a una

INTRODUCCIÓN

transmisión de carácter autosómico dominante, constituyendo sólo el 5 % de los casos de Alzheimer. Aunque la forma familiar es mucho menos frecuente que la forma esporádica, ambas presentan las mismas marcas histopatológicas (placas seniles y ovillos neurofibrilares), lo que sugiere una patogénesis común (Gassen and Annaert 2003). Hasta la fecha, se han identificado tres genes, cuyas mutaciones causan FAD (Alzheimer Familiar): el gen de la proteína precursora del β -amiloide (APP) localizado en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (PS2) situado en el cromosoma 1.

3.1.1 Mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide.

A mediados de los años 80 comenzaron los estudios sobre la proteína precursora del β -amiloide (APP), como determinante genético de AD, debido a la observación en individuos con Síndrome de Down de las características neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer en edades tempranas. Estos datos mostraron la implicación del cromosoma 21 en esta patología. Se pensó entonces que debido a la copia extra de un gen mapeado en el cromosoma 21, estos individuos desarrollaban el fenotipo tipo Alzheimer (Price and Sisodia, 1998). La secuenciación del gen de APP y el estudio para detectar mutaciones en individuos con la enfermedad, confirmaron que el gen de APP estaba asociado a esta patología.

Las mutaciones encontradas en el gen de APP (actualmente se conocen 27 mutaciones; una lista actualizada de mutaciones se puede encontrar en www.uia.ac.be/ADMutations) explican una pequeña proporción, en torno al 5% de los casos de Alzheimer familiar. La secuenciación del exón 17 del gen de APP permitió el descubrimiento de ciertas mutaciones en familias con un desarrollo temprano de AD (ver figura I1).

La primera mutación encontrada afectaba a una familia británica y resulta de la sustitución de una valina por una isoleucina en el codón 717 (mutación "*London*"). Se ha encontrado variables alélicas del codón 717, como sustitución de valina por fenilalanina, valina por leucina, o valina por glicina, pero la más frecuente es valina por isoleucina (Goate et al., 1991). También se descubrieron mutaciones en el codón 670 y 671 en dos familias suecas con Alzheimer familiar, consistentes en un doble cambio de pares de bases, lisina y metionina son reemplazados por ácido aspártico y leucina respectivamente (mutación "*Swedish*"), justo delante del extremo N-terminal de la secuencia aminoacídica correspondiente al péptido β -Amiloide (Mullan and Mullan M, 1992). La mutación "*Flemish*", situada en el codón 692, resulta de la sustitución de una

alanina por una glicina, y da lugar a un fenotipo mixto entre AD y una angiopatía congofílica (Hendriks L et al., 1992).

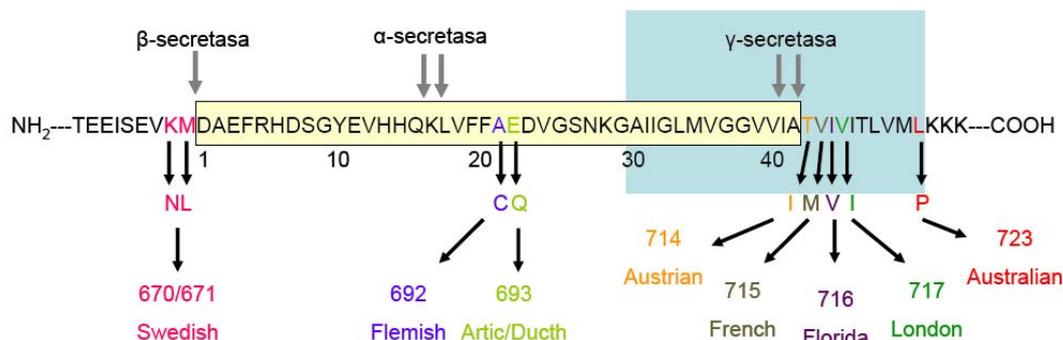


Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la proteína APP, las mutaciones descritas en AD Familiar y sitios de procesamiento. La secuencia del Aβ está encuadrada en el rectángulo de color amarillo claro. El rectángulo celeste delimita el dominio transmembrana. Las flechas de arriba indican los puntos de corte de las secretasas, mientras que la flecha discontinua indica la zona de escisión que genera el péptido amiloide insoluble. Las mutaciones descritas en casos de AD familiar están destacadas en color. Modificado de Evin and Weidemann, 2002.

El motivo por el cual estas mutaciones son tan importantes en la evolución de esta enfermedad, es por que alteran el metabolismo de APP, ya que muchas de ellas están localizadas cerca de los sitios de cortes de las enzimas secretasas que flanquean la secuencia del péptido β-Amiloide, como la mutación *Swedish* (APP 670/671) que produce en cultivos celulares elevados niveles de Aβ soluble (Citron et al., 1992), o la mutación *London* (APP 717) que duplica la producción de las formas más insolubles y de mayor tamaño del péptido β-amiloide (ver más adelante) (Pype et al., 2003; De Jonghe et al., 2001).

3.1.2 Mutaciones en los genes de la presenilina 1 y la presenilina 2.

En el año 1992 se detectó un locus en el brazo largo del cromosoma 14 relacionado con la AD que tiempo después se demostró que pertenecía a presenilina 1 (PS1). Actualmente se cree que las mutaciones en los genes que codifican las presenilinas (PS1 y PS2) engloban aproximadamente el 95% de los casos de Alzheimer familiar (ver revisión de Tandon and Fraser, 2002).

Las mutaciones en PS1 ocurren con frecuencia en residuos altamente conservados que afectan a los dominios transmembrana, así como también en las regiones de la proteína que conectan dichos dominios. Sin embargo, también se han encontrado mutaciones que producen cambios en el resto de la estructura de la proteína. Actualmente se conocen más de 150 mutaciones (ver figura 12). Una lista

INTRODUCCIÓN

actualizada de las mismas se puede encontrar en www.uia.ac.be/ADMutations. Las mutaciones en PS1 son responsables del 70% de los casos de AD familiar, y son también por regla general las más agresivas en cuanto a un inicio precoz de los síntomas y a una evolución rápida (Tandon and Fraser, 2002; Rocchi et al., 2003). Por otro lado, la mayoría de las mutaciones en PS2 también se localizan en dominios transmembrana conservados entre las dos proteínas y suponen el 25% de los casos de AD familiar (actualmente hay 11 mutaciones que se puede encontrar en www.uia.ac.be/ADMutations).

La función más conocida de las presenilinas es como centro activo del complejo γ -secretasa, implicado en el procesamiento de la APP y la generación de A β (ver más adelante). Actualmente se sabe que las mutaciones en presenilina alteran el procesamiento de APP (ver más adelante), llevando a un incremento en la razón A β 42/40 (Duff et al., 1996; Xia et al., 1997; Wang et al., 2006; Bentahir et al., 2006), lo que podría dar lugar a una mayor formación oligómeros y formas fibrilares debido a que el péptido A β 42 es más hidrofóbico y agrega con mayor facilidad (Chen and Glabe, 2006; Wolfe, 2007). Por otra parte, el complejo γ -secretasa es multifuncional y participa en el procesamiento de una gran cantidad de sustratos. En este sentido, resulta imposible saber cómo las mutaciones en presenilina podrían afectar al procesamiento de cada uno de ellos. Si bien, podemos especular que una alteración de otros sustratos como Notch podrían comprometer la supervivencia celular (De Strooper and Annaert, 2010). En conclusión, aunque pueden existir varios mecanismos por los que las mutaciones en PS1 podrían llevar a la patología de Alzheimer, actualmente esta cuestión es objeto de investigación (Sisodia and George-Hyslop, 2002).

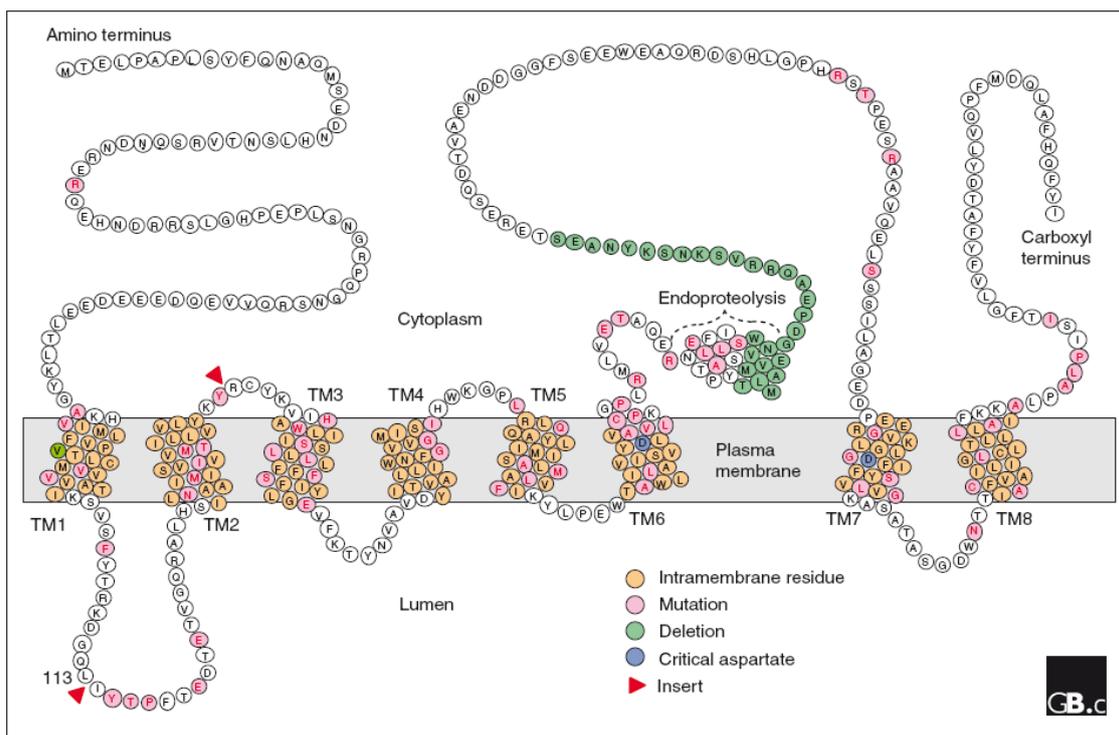


Figura 12. Secuencia de aminoácidos de presenilina-1 no procesada (full-length), y mutaciones descritas en la AD Familiar. La proteína consta de 8 dominios transmembrana. Con un código de colores se indican las mutaciones presentes en el Alzheimer familiar. Adaptado de Tandon and Fraser 2002.

3.2 Alzheimer esporádico

Este tipo de Alzheimer (senil o de inicio tardío), presenta una incidencia baja hasta los 60-65 años de edad, afectando a un 3 ó 4% de la población. A partir de esta edad, el porcentaje de incidencia se duplica cada 5 años, lo que supone que más de la mitad de la población de 80 años puede padecer esta enfermedad. En la forma esporádica de la enfermedad, el principal factor de riesgo no es el genético, ni los factores ambientales, que por sí solos no son suficientes para desencadenar la enfermedad. Por lo tanto, su aparición puede estar determinada por el polimorfismo existente entre los individuos, que pueden predisponer en mayor o menor grado al proceso neurodegenerativo.

Por lo tanto, los genes implicados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer pueden ser agentes causales de la misma y estar implicados en las etapas iniciales, como en los casos de Alzheimer familiar, o bien, ser un factor de predisposición para padecerla, estando más asociados a estadios tardíos y a la forma esporádica (Rocchi et al., 2003).

3.2.1 Gen de la proteína ApoE.

El gen que codifica la proteína ApoE es el único que ha podido identificarse a través de análisis de genética molecular como una variante que constituye un factor de riesgo confirmado tanto para la AD de presentación tardía como para las formas más precoces de esta enfermedad degenerativa (Rocchi et al., 2003; Mahley et al., 2006). La proteína ApoE está implicada en el metabolismo lipídico, mantenimiento y remodelación neuronal, retirada de toxinas y en la reparación de tejidos. En el cerebro, los astrocitos y la microglía son las principales células productoras de ApoE (Poirier, 2000). En este sentido, se han identificado tres formas polimórficas que aparecen comúnmente en la población de esta proteína llamadas ApoE2, ApoE3 y ApoE4, codificadas por las variantes o alelos del gen ApoE llamados $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Los niveles de ApoE son elevados en enfermedades neurodegenerativas severas, como en la AD (Mahley et al., 2006). Esta proteína parece estar implicada en la formación de placas amiloides y agregados neurofibrilares, al interaccionar tanto con el péptido A β como con la proteína tau. De hecho, se ha demostrado que ApoE4 es capaz de modular el procesamiento de la proteína APP e incrementar la producción de A β (Ye et al., 2005). Además, ApoE4 puede actuar de forma independiente al péptido A β . Esta proteína puede ser procesada por proteasas en el medio ácido de lisosomas, generándose fragmentos tóxicos que afectan al funcionamiento mitocondrial (Mahley et al., 2006). Finalmente, también cabe destacarse que la ApoE4 es capaz de estimular la producción de prostaglandina E2, factor inflamatorio producido por la microglía, lo que también contribuye a la patogénesis de la AD (Shuang et al., 2005).

3.2.2 Factores de riesgo no genéticos

Otros factores no genéticos también guardan relación con la probabilidad de padecer esta patología. En este sentido, y como ya hemos comentado al principio de esta introducción, el envejecimiento es el principal factor de riesgo. La prevalencia del Alzheimer aumenta con la edad y se duplica cada 5 años entre los 65 y 85 años (Castellani et al., 2010). Actualmente, se piensa que esto podría ser debido al daño producido por los radicales libres del metabolismo celular (Mattson and Magnus, 2006). De hecho, el estrés oxidativo *per sé* también es un factor de riesgo que posee implicaciones importantes en el inicio, progresión y patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Los radicales libres de oxígeno pueden contribuir a daños en la membrana, citoesqueleto y la muerte celular (Zhu et al., 2007).

Por otro lado, el género también es un factor de riesgo, dado que la mujer tiene un riesgo mayor que el hombre de padecer la enfermedad de Alzheimer (Reiman and Caselli, 1999), independientemente de su mayor longevidad. En este sentido, se han propuesto factores hormonales, ya que los estrógenos disminuyen la producción de A β en cultivos celulares (Turner, 2001). Además, se conoce que los estrógenos poseen un papel neuroprotector, por lo que su pérdida con la edad en la mujer podría incrementar las probabilidades de desarrollar la enfermedad (Maccioni et al., 2009).

Actualmente, también se conoce que los problemas cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis, el infarto o la isquemia cerebral incrementan la probabilidad de desarrollar la AD. Las enfermedades cardiovasculares pueden desencadenar, además, demencia vascular, que es la segunda causa de demencia tras la AD. Recientemente, se ha descrito que las enfermedades cardíacas y los infartos aumentan el deterioro de las personas que padecen AD y que pueden contribuir al inicio de la enfermedad. En este sentido, no sólo las enfermedades cardiovasculares sino también otras como el síndrome de Down, la diabetes mellitus o los procesos inflamatorios pueden aumentar la probabilidad de padecer esta patología (Zhu et al., 2005; Ryoo et al., 2008; McGeer and McGeer, 2001).

4. Procesamiento de la proteína APP y generación del péptido A β .

La proteína precursora del β -amiloide (APP) comprende un grupo heterogéneo de proteínas pertenecientes a la familia de las glucoproteínas transmembrana del tipo I, que contiene una señal terminal peptídica, un gran ectodominio para N-glicosilaciones, una región transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático. Esta proteína se expresa en la mayor parte de los tipos celulares (Kang et al., 1987). Esta heterogeneidad es debida al '*splicing*' alternativo que da lugar a tres isoformas de 695 (APP₆₉₅), 751 (APP₇₅₁) y 770 (APP₇₇₀) aminoácidos respectivamente. Las formas de APP que contienen 751 y 770 aminoácidos son ampliamente expresadas en células no neurales, mientras que los mayores niveles de APP neuronales corresponden a la isoforma 695 (Haass et al., 1991). La diferencia entre las isoformas 751/770 respecto a la isoforma 695 es la presencia de un exón que codifica una secuencia de 56 aminoácidos homóloga a una proteasa inhibidora de serina de tipo Kunitz.

Así mismo, la proteína APP es extensamente modificada por glucosilaciones (N- u O- glucosilaciones) complejas que ocurren justo después de sintetizarse la proteína APP en el retículo endoplasmático. Además, fosforilación y sulfatación tienen

INTRODUCCIÓN

lugar durante el tránsito hacia la membrana plasmática en la vía secretora (Walter et al., 1997). Durante la secreción e internalización a través de la vía secretora, APP puede sufrir diversas escisiones proteolíticas por tres proteasas llamadas α -, β -, γ -secretasa. Dichas escisiones se agrupan en dos vías: la **vía amiloidogénica** y la **vía no amiloidogénica**.

La primera actividad proteolítica descrita fue la denominada α -secretasa, la cual realiza una escisión en el APP695 dentro del dominio $A\beta$ entre los residuos Lys687 y Leu688 (residuos aminoacídicos 16 y 17 de $A\beta$). Como consecuencia de este procesamiento proteolítico se libera el ectodominio N-terminal de APP (α -APPs) al espacio extracelular o al lumen vesicular, incluyendo los residuos aminoacídicos del 1 al 16 del $A\beta$, mientras que queda anclado a la membrana una secuencia de 83 residuos, correspondientes al extremo C-terminal (APP-C83) (ver figura I3.A). La producción de α -APPs se incrementa como respuesta al potencial de membrana y a la activación de los receptores muscarínicos, sugiriendo esto que la actividad neuronal incrementa el procesamiento proteolítico de APP por la α -secretasa. Las proteínas con actividad α -secretasa más implicadas probablemente en el procesamiento de APP por esta vía son miembros de la familia de las desintegrinas y metaloproteasas (ADAM). Parece ser que ADAM10 es el mejor candidato para α -secretasa, ya que su sobre-expresión estimula de forma consecutiva la actividad de la proteína quinasa C y la secreción del ectodominio α -APP. Otros candidatos son TACE, proteasa que procesa TNF α (factor de necrosis tumoral- α) y otros miembros de la familia ADAM (ver revisiones (Maccioni et al., 2009; Selkoe, 2001; Morishima-Kawashima and Ihara, 2002; Sisodia and George-Hyslop, 2002; Gassen and Annaert, 2003).

La escisión por la γ -secretasa (ver más adelante) entre los residuos aminoacídicos 711 y 713, libera un péptido llamado p3 ($A\beta$ 17-40 y $A\beta$ 17-42) al lumen extracelular o vesicular, y por otra parte el dominio intracelular de APP (AICD) al citosol celular. El fragmento citosólico de APP (AICD) forma parte de un complejo activo de transcripción junto con FE65 y TIP60. Este complejo se transloca al núcleo participando en la regulación de varios genes.

Alternativamente, la molécula de APP puede sufrir una escisión diferente. La actividad β -secretasa, procesa APP entre los residuos aminoacídicos Met671 y Asp672, originándose un ectodominio N-terminal soluble denominado β -APPs, ligeramente más pequeño que sAPP- α . en tanto que la secuencia anclada en la membrana, en este caso, es de mayor tamaño. Concretamente, este péptido contiene

99 residuos aminoacídicos (APP-C99). La actividad β -secretasa se atribuye a la proteína conocida como BACE 1 (*β -site APP cleaving enzyme 1*), que es la principal, sino la única, proteína con esta actividad en cerebro (Vassar et al., 2009). Posteriormente, la secuencia anclada a la membrana es sustrato para la γ -secretasa, que realiza una escisión proteolítica dentro del dominio transmembrana a nivel de los residuos aminoacídicos 711-713, dando lugar a un péptido β -amiloide de 48-49 residuos y al dominio intracelular del APP (AICD) (figura I3.A). Este péptido de 48 o 49 aminoácidos es generado por el procesamiento- ϵ propio del complejo γ -secretasa. A su vez, estos péptidos dan lugar a los de 42 o 40 aminoácidos respectivamente tras sufrir el procesamiento- γ también dentro del propio complejo. El procesamiento- γ consiste en escisiones de los últimos 3 residuos del extremo C-terminal en varios pasos sucesivos. De esta forma, el péptido de 49 residuos pasa a tener 46 y 43, para dar lugar finalmente al A β 40; y del mismo modo el de 48 residuos es procesado para generar uno de 45, que finalmente da lugar al A β 42 (ver figura I3.B) (Takami et al., 2009).

INTRODUCCIÓN

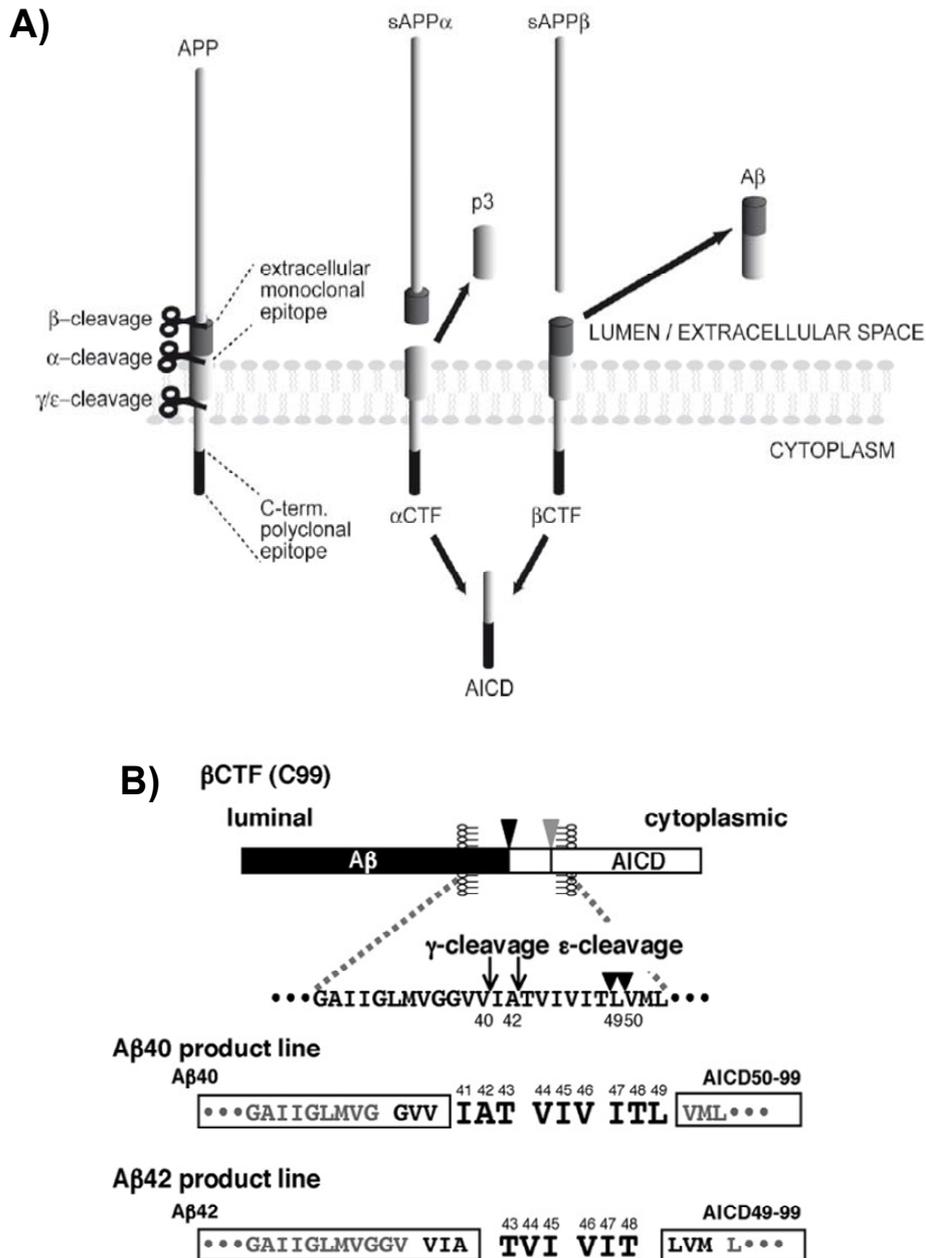


Figura I3. Procesamiento de la proteína APP y generación del péptido Aβ. A) Representación esquemática de las vías amiloidogénica y no amiloidogénica. La escisión de la α-secretasa impide la formación del β-amiloide. B) El péptido Aβ inicialmente presenta 48 o 49 aminoácidos y posteriormente son procesados hasta las formas de Aβ40 y 42 presentes de forma fisiológica, mediante liberación sucesiva de varios tripéptidos. Adaptado de Bai et al., 2008; Takami et al., 2009.

4.1 Procesamiento β-secretasa y BACE-1

El hecho de que BACE-1 sea la principal proteína con actividad β-secretasa viene precedido por las evidencias obtenidas en modelos murinos *Knock-out para BACE*, que se presentan carentes de producción de Aβ. Poco después del

descubrimiento de BACE-1, se encontró una proteína homóloga denominada BACE-2, que comparte con BACE-1 el 64% de la secuencia aminoacídica. Sin embargo, la expresión de BACE-2 es muy baja en neuronas y no presenta actividad β -secretasa sobre la proteína APP, lo que indica que este homólogo aparentemente no es un candidato válido para desarrollar la actividad β -secretasa en cerebro (ver revisión; (Vassar et al., 2009).

BACE-1 es una aspartil-proteasa transmembrana de tipo 1, que se localiza principalmente en el trans-Golgi y en compartimentos endosomales, en concordancia con datos previos que demuestran que la actividad β -secretasa tiene lugar en estos compartimentos. Inicialmente, BACE1 se genera como pre-pro-enzima, y sufre complejas modificaciones postraduccionales a través de la vía secretora que incluyen N-glicosilación, fosforilación, formación de puentes disulfuro, y un procesamiento proteolítico que da lugar a la forma madura. Una vez liberada de su predominio, la forma madura posiblemente se sitúa en los dominios de membrana *rafts* lipídicos donde ejerce su actividad catalítica (Ehehalt et al., 2003). Posteriormente, y al igual que la proteína APP, se internaliza a través de la vía endocítica hacia los endosomas, donde se localiza con la proteína APP y tiene lugar el procesamiento β -secretasa, debido al pH ligeramente ácido óptimo para BACE-1 de este compartimento (Vassar, 2001; Vassar et al., 2009).

Finalmente, aunque BACE-1 ha recibido la mayor atención como enzima que procesa a APP, otros sustratos han sido propuestos para BACE-1, lo que sugiere que BACE-1 podría presentar gran variedad de funciones fisiológicas. Entre ellos, se encuentran varias proteínas transmembrana localizadas en trans-Golgi como las neuropéptidasa-1 y 3 (NRG), la subunidad $\beta 2$ del canal de sodio regulado por voltaje ($\text{Na}_v\beta 2$), los receptores de lipoproteínas (LRP), PSLG-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), entre otros. BACE-1 es actualmente una de las posibles dianas terapéuticas en el tratamiento de la AD y de hecho, se han desarrollado varias moléculas capaces de inhibir *in vitro* el procesamiento de APP por BACE-1. Sin embargo, aun no se dispone de una molécula inhibidora de vida media adecuada, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, e inhibir selectivamente a BACE-1 y no otras aspartil-proteasas, aunque se han realizado importantes avances recientemente (De Strooper et al., 2010; Sankaranarayanan et al., 2009).

4.2 Procesamiento γ -secretasa y presenilinas.

La γ -secretasa, que procesa APP dentro de la región transmembrana, implica la participación de cuatro subunidades diferentes: Presenilina, Nicastrina, Aph-1 y Pen 2 (De Strooper, 2003). El sitio activo de la γ -secretasa, requiere actividad aspartil proteasa que se encuentra en la presenilina, mientras que nicastrina, Pen-2 y Aph1 participan en la modulación de la actividad de la γ -secretasa (Sisodia and George-Hyslop, 2002; Blennow et al., 2006).

Las presenilinas (PS1 y PS2) son unas proteínas que comparten gran homología, hasta 90% en sus dominios transmembrana. Se sintetizan como polipéptidos de 42-50 kDa y experimentan endoproteolisis, para dar lugar a un fragmento N-terminal (PS-NTF) de 27-30 kDa y un fragmento C-terminal (PS-CTF) de 16-20 kDa, generándose así el centro activo del complejo enzimático, una vez que se han ensamblado las 4 subunidades (Thinakaran et al., 1996) (ver también figura I2). El papel de presenilasa se ha atribuido a Pen-2, ya que su regulación a la baja induce simultáneamente la acumulación de presenilina no procesada (*full-length*) en una conformación estable (Takasugi et al., 2003). Este procesamiento endoproteolítico está altamente regulado y es saturable, ya que la sobre-expresión de PS1 en células transfectadas o en ratones transgénicos no aumenta el nivel de NTF y CTF, y el exceso de holoproteína se degrada rápidamente, mayoritariamente por el proteasoma (Thinakaran et al., 1996). Del mismo modo, la sobre-expresión inducida de cualquier de las cuatro subunidades por separado no induce un incremento de la actividad γ -secretasa, sino que es necesario que se sobre-expresen las 4 simultáneamente para que esto ocurra (De Strooper, 2003).

El ensamblaje del complejo γ -secretasa posiblemente ocurre en varios ciclos de intercambio vesicular entre retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Una vez que el complejo maduro está ensamblado y se produce la endoproteolisis de la presenilina, el complejo pasa el control de calidad y es vesiculado hacia la membrana plasmática y otros compartimentos celulares, donde tiene lugar su actividad catalítica sobre APP y otros sustratos. Además del papel en la vía amiloidogénica, γ -secretasa participa en el procesamiento de otros sustratos como Notch, caderinas, LDR (receptores de LDL), CD44, Nectina-1 α , entre otros, que participan en varias funciones celulares como la estabilización de β -catenina, la homeostasis del calcio, la adhesión celular, todas ellas esenciales para la supervivencia celular (Wakabayashi and De Strooper, 2008; Parent AT. and Thinakaran, 2010).

Finalmente, cabe destacar que actualmente no se puede asumir que exista un único complejo γ -secretasa debido a la presencia en mamíferos de dos proteínas homologas para PS (PS1 y PS2) y APH-1 (APH-1a y APH-1b). Asumiendo una estequiometría 1:1:1:1, podrían existir al menos cuatro complejos distintos, sin tener en cuenta las distintas isoformas que pueden aparecer consecuencia del *splicing* alternativo sobre PS1 y APH-1a (Gu et al., 2003). En cualquier caso, esta posibilidad deja abierta nuevas cuestiones, como si distintos complejos podrían procesar distintos sustratos en distintos compartimentos celulares, o bien, qué parámetros fisiológicos y patológicos determinan el ensamblaje de unos complejos sobre otros (De Strooper, 2003; De Strooper and Annaert, 2010).

Al igual que para BACE-1, el complejo γ -secretasa también es actualmente una posible diana terapéutica en el tratamiento de la AD. Existen varias moléculas capaces de inhibir de forma no selectiva el complejo, por lo que su inhibición normalmente se acompaña de una disminución en el procesamiento de otros sustratos necesarios para la supervivencia neuronal. En este sentido, teniendo en cuenta el gran número de proteínas que pueden ser procesadas por γ -secretasa, se plantea como un objetivo difícil obtener un inhibidor específico del procesamiento de APP, aunque recientemente se han obtenido compuestos capaces de inhibir el procesamiento de APP sin afectar al de Notch (De Strooper et al., 2010).

4.3 Enzimas implicadas en la degradación del péptido A β

Se han identificado múltiples enzimas que pueden estar implicadas en la degradación del péptido A β en el cerebro. Algunas de ellas degradan al A β en su estado monomérico, otras que lo degradan en su estado oligomérico y alguna en su estado más agregado (fibrilar) (ver revisiones (Selkoe, 2001b; Vardy et al., 2005):

- Nephelisa: metalopeptidasa dependiente de zinc, que actúa sobre una gran cantidad de sustratos como glucagón, encefalinas, sustancia P, neurotensina, etc. Es capaz de degradar el péptido A β en su estado monomérico, y se le ha atribuido la capacidad de degradar también el oligomérico (Kanemitsu et al., 2003). A nivel celular, nephelisa se localiza mayoritariamente anclada en la membrana de la superficie celular.
- IDE (*insulin degrading enzyme*): tiol-metalopeptidasa dependiente de zinc, capaz de degradar diversos péptidos, como la insulina, el

INTRODUCCIÓN

glucagon, TGF- α , etc. Degrada el péptido A β en su forma monomérica. Se encuentra mayoritariamente como una proteína soluble citosólica, aunque también puede detectarse en la superficie celular y en membranas intracelulares.

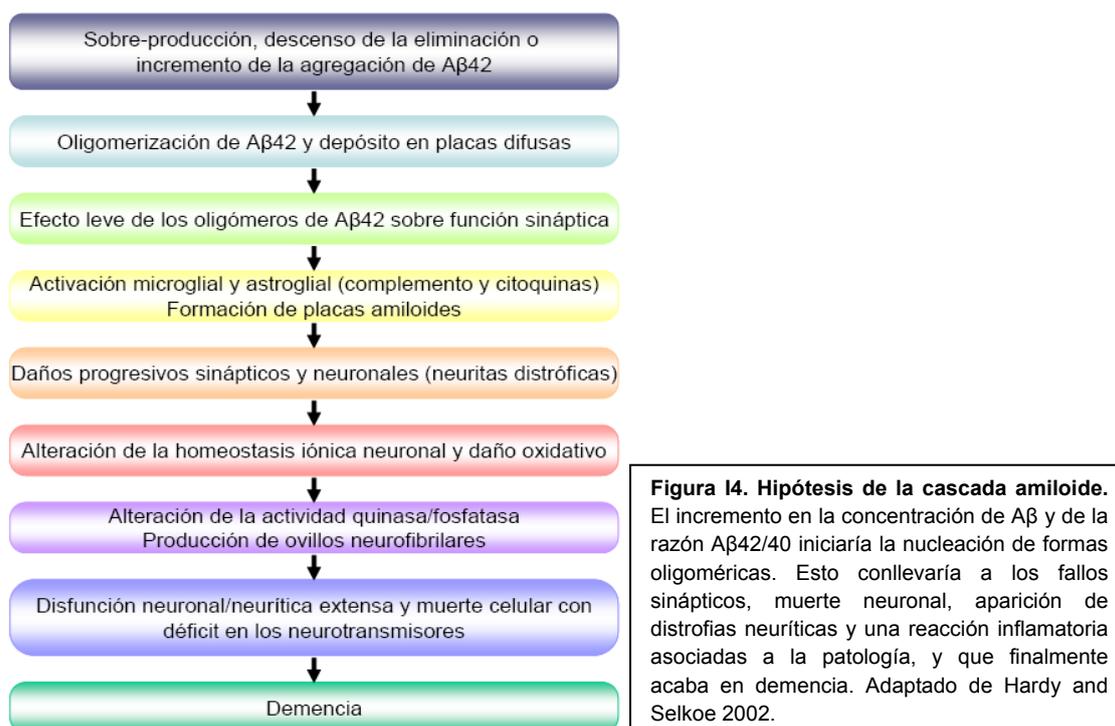
- ECE-1(*endothelin convertin-enzyme-1*): metaloproteasa homóloga a la neprelisina que es capaz de degradar A β en su forma monomérica.
- Plasmina: serin-proteasa, que participa en la fibrinólisis. La plasmina es capaz de degradar los monómeros de A β y en menor grado sus formas fibrilares.
- Catepsina B: enzima lisosomal que participa en la degradación de oligómeros y fibras del péptido A β , generando especies truncadas en el extremo C-terminal con menor capacidad de agregación (Mueller-Steiner et al., 2006).

5. Hipótesis de la cascada amiloide

Actualmente, la hipótesis de la cascada amiloide establece al péptido A β como el principal agente acusante de la patología (Hardy and Selkoe, 2002). Esta hipótesis ha sido cuestionada ya que no siempre el número de placas de A β correlaciona con la severidad de la patología. Sin embargo, en la última década se ha descrito la existencia de formas solubles y oligoméricas de A β , capaces de difundir en el parénquima cerebral, provocando pérdida sináptica y fallos cognitivos severos (Haass and Selkoe, 2007).

En consecuencia, la hipótesis de la cascada del A β ha sido modificada en los últimos años, de modo que, determinados cambios en el metabolismo del A β provocarían el inicio de la cascada, generando una elevación de los niveles de A β y de la proporción A β 42/A β 40, ya fuera por sobreproducción o por falta de aclaramiento. Debido a que la forma A β 42 es más hidrofóbica que la A β 40, tiende a oligomerizar más fácilmente, lo que potenciaría la formación de oligómeros difusibles. Estos provocarían cambios en la función sináptica, primero muy sutiles y, posteriormente, más severos. Junto con el aumento en los niveles de A β a nivel extracelular, aparecerían las primeras placas extracelulares y la consecuente activación de la respuesta inflamatoria (astroglía y microglía), lo que provocaría la pérdida de espinas sinápticas y generaría neuritas distróficas. Con el tiempo, se produciría estrés

oxidativo y se vería afectada la homeostasis neuronal. Posteriormente, estos cambios neuronales provocarían que la actividad fosfatasa de las quinasas estuviera alterada, produciendo la hiperfosforilación de la proteína tau y consecuentemente, los daños en el transporte axonal y la formación de ovillos neurofibrilares. Finalmente, la cascada terminaría con la muerte neuronal masiva y un estado de demencia progresivo (Haass and Selkoe, 2007) (ver figura 4).



En lo que respecta al mecanismo de acción del péptido Aβ, existen teorías que intentan explicar la relación que existe entre estos péptidos y su acción citotóxica. Una de ellas es la teoría inflamatoria, ya que el péptido Aβ es capaz de atraer a la microglía e inducir su activación (Akiyama et al., 2000), lo que puede producir mediadores pro-inflamatorios y sustancias neurotóxicas que contribuyan al daño neuronal. En este sentido, recientes evidencias sugieren que la reacción glial asociada a los depósitos de Aβ podría tener un papel neuroprotector más que neurotóxico, y que las formas solubles y oligoméricas de Aβ podrían ser responsables de la activación glial hacia un fenotipo citotóxico (ver más abajo y Jimenez et al., 2008).

Otros estudios han demostrado también la neurotoxicidad del Aβ mediada por calcio, ya que este péptido, y especialmente sus formas oligoméricas solubles pueden integrarse en las membranas y formar canales permeables al calcio (Nimrich et al.,

INTRODUCCIÓN

2008; Demuro, 2005), lo que ocasionaría un aumento de la concentración intracelular de calcio (Kawahara and Kuroda, 2000). Una alteración en la homeostasis del calcio puede promover muchos procesos neurodegenerativos, mediados entre otros mecanismos por la formación de radicales libres (Yatin et al., 1998) y la fosforilación de la proteína tau (Takashima et al., 1993).

También han sido propuestos otros mecanismos, como la activación de diferentes rutas de señalización celular, como la c-Jun N-Terminal quinasa (JNK) que termina en la activación de caspasas y la consecuente muerte celular por apoptosis (Nagata, 1997); o bien, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de un mecanismo aún no muy claro, pero que finalmente puede conducir a peroxidación lipídica y oxidación de proteínas, que comprometen la integridad de la membrana y pueden llevar a la muerte neuronal (Varadarajan et al., 2000).

6. Modelos transgénicos empleados en el estudio de la AD

Aunque la enfermedad de Alzheimer familiar constituye solo el 5% del total de casos de Alzheimer, su descubrimiento ha sido extremadamente importante para el hallazgo de mutaciones en los genes APP, PS1 y PS2, responsables de las formas hereditarias de esta enfermedad (Price and Sisodia, 1998), y para el desarrollo en los últimos años de diferentes modelos animales transgénicos que, aunque no reproducen la totalidad de las características de la AD, sí proporcionan una valiosa información sobre su patogénesis. Estos modelos, difieren en el fondo genético de los animales utilizados, en la mutación seleccionada, en el promotor utilizado, y en la técnica empleada para su obtención, por lo que existen grandes diferencias en las características neuropatológicas que manifiestan. Los principales modelos desarrollados son:

Ratones transgénicos PS1, que sobre-expresan una forma mutada de la PS1 humana. Como consecuencia presentan una razón de A β 42/A β 40 incrementada, pero no desarrollan placas, ni muestran pérdida neuronal (Borchelt et al., 1997).

Ratones transgénicos APP, que sobre-expresan la forma *wild-type* del gen APP humano. Para que se consigan altas cantidades de A β es necesario que el transgen esté bajo el control de un promotor constitutivo cuyo gen se exprese en grandes cantidades, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF: *Platelet-derived growth factor*), el promotor del gen de la proteína priónica (PrP) y el promotor de ratón Thy-1 (miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas,

marcador de células madres hematopoyéticas). También es posible obtener ratones transgénicos APP introduciendo un transgén de la proteína APP humana con alguna de las mutaciones que aparecen en casos de Alzheimer familiar. Estos animales sí desarrollan placas y presentan hiperfosforilación de tau aunque carecen de ovillos, por lo que son mejores modelos que los anteriores. Presentan neuritis distróficas y procesos inflamatorios, pero carecen de pérdida neuronal. Los estudios de comportamiento han revelado que estos animales manifiestan ansiedad, hiperactividad, convulsiones y agresividad. Sin embargo, estos cambios sólo son apreciables a edades relativamente tardías, entre los 9 y 12 meses de edad.

Ratones transgénicos PS1xAPP, que sobre-expresan ambas proteínas humanas mutadas. En este caso, las manifestaciones patológicas de la enfermedad aparecen a edades comprendidas entre los 4 y los 6 meses, lo que los convierte en modelos más interesantes (Seabrook and Rosahl, 1999). Sin embargo tampoco reproducen totalmente la AD, ya que no presentan ni ovillos neurofibrilares, ni muerte neuronal masiva.

Una alternativa consiste en un modelo que porta 5 mutaciones de la enfermedad de Alzheimer familiar, denominado **5xFAD**, que posee una deposición de A β muy acelerada (Ohno et al., 2006). Este animal PS1xAPP expresa las mutaciones *Swedish* (APP K670N/M671L), la *Florida* (I716V), la mutación *London* (V717I) y dos en el gen de la presenilina 1 (M146L y L286V). Posee acumulación de A β 42 intracelular desde los 1,5 meses de edad. La deposición extracelular comienza a partir de los 2 meses, y la pérdida neuronal a los 9 meses de edad.

Ratones transgénicos tau, que sobre-expresan la proteína humana componente principal de los ovillos. Sin embargo, al sobre-expresar tau silvestre, sólo se ha conseguido desarrollar ovillos en un modelo y a partir de los 24 meses (Gotz, 2001). Al igual que ocurre en los transgénicos APP y PS1xAPP, los transgénicos tau tampoco desarrollan pérdida neuronal masiva.

Por lo tanto, ninguno de estos modelos ha sido capaz de reproducir al completo todas las manifestaciones patológicas que caracterizan a la enfermedad de Alzheimer. Para conseguir la manifestación conjunta de placas de A β y ovillos neurofibrilares, fue necesario crear un **ratón triple transgénico PS1xAPPxtau**, que sobre-expresa las proteínas humanas PS1, APP y tau (Oddo et al., 2003).

6.1 El doble transgénico PS1xAPP como modelo animal de la AD.

En el presente trabajo se han utilizado ratones dobles transgénicos PS1xAPP, considerados buenos modelos de la AD (Schmitz et al., 2004). En este modelo animal, la sobre-expresión de las mutaciones humanas del APP (mutación Swedish y London, KM670/671NL y V717I, promotor Thy-1) y de PS1 (M146L, promotor HMG-CoA reductasa) conduce a diferentes manifestaciones que reproducen algunos de los rasgos neuropatológicos de la enfermedad:

Aparición de depósitos de A β en el hipocampo, la corteza y en el subículo desde los 2-3 meses de edad (Blanchard et al., 2003), y que van aumentando progresivamente conforme el animal envejece, al igual que ocurre en otros modelos animales (Duyckaerts et al., 2008).

Fosforilación de la proteína tau a edades tardías del animal, aunque no aparecen ovillos neurofibrilares.

Afectación temprana del sistema GABAérgico. En los animales PS1xAPP se produce desde los 4 meses de edad la muerte de una población de interneuronas GABAérgicas localizadas en el *stratum oriens* e hilo del giro dentado en el hipocampo, así como en corteza entorrinal, y que co-expresan somatostatina y neuropéptido Y (NPY) ((Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009). La pérdida de dichas neuronas también ocurre en enfermos de Alzheimer y en otros modelos animales de la enfermedad (Kumar-Singh et al., 2005; Horgan et al., 2007), así como en el proceso normal de envejecimiento (Vela et al., 2003). Es destacable que la expresión de parvalbúmina (PV), péptido vasoactivo intestinal (VIP) o incluso de GAD 65, enzima implicada en la síntesis del neurotransmisor GABA, no presentan variaciones significativas a edades tempranas. La pérdida de interneuronas GABAérgicas SOM/NPY parece implicar una reducción de la plasticidad sináptica de las células principales y conducir a trastornos de memoria y aprendizaje, síntomas descritos en los primeros estadios de la enfermedad de Alzheimer (Walsh and Selkoe, 2004).

Afectación colinérgica tardía. Esta reducción de neuronas colinérgicas también se ha observado en modelos transgénicos que sobre-expresan APP₇₇₀ humano (Li and Shen, 2000) y en estadios avanzados de la enfermedad de Alzheimer (Davis et al., 1999), cuando resulta prácticamente imposible ningún tipo de intervención terapéutica.

Muerte limitada de neuronas principales hipocampales (piramidales de las regiones CA1-CA3 y granulares del giro dentado), de naturaleza glutamatérgica, a partir de 17 meses (Schmitz et al., 2004), lo que corresponde a fases muy tardías de la enfermedad, y sólo en torno a un 30% (Jimenez et al., 2008). En enfermos de Alzheimer, la muerte neuronal ocurre ya en las primeras fases de la enfermedad como ya hemos mencionado anteriormente (ver apartado 2 de ésta introducción). La ausencia de neurodegeneración en estos animales se ha asociado a un aumento de los niveles de transtirretina y a la activación de múltiples genes neuroprotectores y/o de rutas de supervivencia celular (Schwarzman et al., 1994). Desde este punto de vista, estos animales podrían ser un excelente modelo para comprender cómo el cerebro puede adaptarse y sobrevivir a niveles altos de A β .

Reacción inflamatoria. En nuestro modelo se produce una activación glial a partir de 4 meses de edad, coincidiendo cronológica y físicamente con la aparición de placas extracelulares del β -amiloide, que se incrementa durante el proceso de envejecimiento.

Según la hipótesis inflamatoria de la enfermedad de Alzheimer, la activación de la microglía, en respuesta a la deposición de A β podría mediar la degeneración neuronal, mediante la liberación de factores citotóxicos, tales como citoquinas pro-inflamatorias (TNF-alpha, FASL, TRAIL, IL-1beta e IL-6 entre otras), aminoácidos excitadores, especies reactivas de oxígeno (NO, superóxido) u otros factores (Mrak and Griffin, 2005; Ranaivo et al., 2006; Ranaivo et al., 2006; Zipp and Aktas, 2006). Este papel citotóxico mediado por la activación glial está avalado por estudios clínicos que demuestran que los síntomas del Alzheimer pueden atenuarse mediante el uso de fármacos anti-inflamatorios no-esteroides (Aisen, 2000).

Sin embargo, este punto de vista es controvertido ya que otros ensayos clínicos no parecen encontrar ningún efecto positivo con estos agentes anti-inflamatorios (Aisen et al., 2003), por lo que también es posible que la activación glial (astro- y microglía) en respuesta a los depósitos de A β pueda dar lugar a una respuesta beneficiosa, pro-regeneración y de supervivencia neuronal, mediada por la producción de citoquinas anti-inflamatorias y/o factores de crecimiento neuronal, fagocitosis y degradación de A β extracelular (Butovsky et al., 2006; Streit, 2005).

Esta aparente discrepancia podría ser explicada por la existencia de distintos fenotipos en la microglía activada. Al igual que los macrófagos periféricos, la microglía

INTRODUCCIÓN

puede presentar, como mínimo, dos estados de diferenciación (Heneka and O'Banion, 2007; Edwards et al., 2006). En primer lugar, una **activación clásica**, caracterizada por la expresión de citoquinas citotóxicas (TNF- α , FASL, TRAIL), iNOS y NAPDH oxidasa; y en segundo lugar, una **activación alternativa**, caracterizada por la ausencia de citoquinas y/o factores tóxicos y por la expresión de Arginasa-1 (implicada en la síntesis de poliaminas), YM-1 (quitinasa implicada en la degradación de la quitina de parásitos), FIZZ (antigen resistin-like molecule-alpha, sin función conocida) e IGF-1 (*Insulin like growth factor-1*, descrito como un factor de supervivencia neuronal), entre otros.

En este sentido, la respuesta inflamatoria en nuestro modelo a edades tempranas (4-6 meses) se caracteriza por una activación de la microglía que se produce de forma exclusiva, rodeando e infiltrando las placas de A β , mientras que la activación astrogliar es más generalizada en el parénquima hipocampal (Jimenez et al., 2008). Además en el hipocampo de nuestro modelo a los 6 meses, la activación microglial no se caracteriza por un fenotipo clásico, ya que no se detectan cambios significativos en la expresión de factores citotóxicos como TNF- α , FASL, TRAIL, iNOS, COX-2, NOX2 e IL-6 con respecto a los animales *wild-type*. Por el contrario, la microglía activa, expresa al menos dos marcadores característicos del estado de activación alternativa, YM-1 e IGF1. Además, ensayos de inmunocitoquímica fluorescente sugieren que esta microglía activada es capaz de fagocitar e internalizar A β . Por todo ello, podemos concluir que la microglía en los primeros estadios de la patología desarrollada en nuestro modelo transgénico se diferencia a un estado alternativo, probablemente neuroprotector y no citotóxico (Jimenez et al., 2008).

Sin embargo, a edades más avanzadas aparece en el hipocampo de nuestro modelo un escenario muy diferente. En concreto, a los 18 meses, la activación de las células de la microglía no se limita exclusivamente al área que rodea las placas de A β , sino que además aparece en todo el parénquima hipocampal, coincidiendo con un importante incremento en la expresión de factores citotóxicos, principalmente TNF- α , aunque también FASL, TRAIL, COX-2 y NOX-2. Estudios de inmunocitoquímica han mostrado igualmente, que la microglía activada en torno a placas no es responsable de la producción de estos factores, y que de hecho, estas células continúan expresando un fenotipo alternativo caracterizado por la expresión de YM-1 y la producción de IGF-1 a los 18 meses. Por tanto la microglía reactiva interplaca que aparece en esta edad es la principal responsable de la producción de estos factores

citotóxicos. Además la astrogliá interplaca activada a esta edad se caracteriza por un aumento significativo en la expresión de iNOS (NO sintasa inducible). Estos resultados claramente demuestran la existencia a edades avanzadas de dos estados de activación microglial diferentes, un estado alternativo no citotóxico, que está rodeando, y que posiblemente fagocita las placas de A β , que se manifiesta desde las edades tempranas en que éstas aparecen, y un estado de activación clásico citotóxico, distribuido por todo el parénquima hipocampal en las regiones inter-placa, y que se manifiesta exclusivamente en edades avanzadas. Además, cabe destacarse que la degeneración de las neuronas piramidales hipocampales que se produce también a los 18 meses en nuestro modelo, coincide con la aparición del fenotipo clásico de la microglía.

Por una parte, nuestros resultados en el hipocampo de los animales PS1xAPP demuestran que no existe aparentemente relación entre los depósitos del amiloide y la aparición del fenotipo clásico en la microglía con la consiguiente producción de factores citotóxicos. De hecho, al parecer la activación glial alternativa inducida en torno a placas parece tener un papel de pro-supervivencia neuronal, lo que explicaría la escasa neurodegeneración observada en animales jóvenes (6 meses). No obstante, actualmente aun es desconocido el modo en que se induce este fenotipo alternativo, así como los factores que realmente llevan a esta diferenciación por parte de la microglía que rodea las placas.

Por otra parte, nuestro modelo presenta con el envejecimiento un fuerte aumento en la concentración de formas oligoméricas solubles y extracelulares del péptido A β (también denominados ADDLs), que se comportan como agentes responsables de la diferenciación hacia el fenotipo clásico en cultivos mixtos de astro-microglia. Estos oligómeros de A β no se detectan a los 6 y 12 meses de edad, pero están claramente presentes a los 18 meses, como hemos podido constatar utilizando anticuerpos que reconocen específicamente formas oligoméricas de estos péptidos (ver figura R1 en apartado de resultados) (Jimenez et al., 2008).

En la corteza entorrinal hemos observado un fenómeno similar al descrito en el hipocampo, pero a edades mucho más tempranas. De hecho, a los 4 y 6 meses de edad se observa una activación microglial alternativa (YM-1 positivas, IGF-1 positivas), rodeando a las placas de A β (al igual que sucedía en el hipocampo) y activación clásica (TNF- α positivas) de la microglía interplaca. Aunque no hemos podido determinar la presencia de formas oligoméricas (debido a que esta región cerebral es

INTRODUCCIÓN

extremadamente pequeña y es necesario utilizar un micro-disector láser para su disección), es perfectamente posible que dichas formas se acumulen en la corteza entorrinal a edades tempranas. De hecho, esta es una de las primeras áreas (junto con el subículo) en presentar placas de Abeta en nuestro modelo (Blanchard et al., 2003).

En resumen, los animales PS1xAPP, modelo animal utilizado en el presente trabajo, muestran algunos, pero no todos los rasgos neuropatológicos de la AD, a pesar de lo que constituyen una herramienta de gran utilidad para el estudio de esta patología.

7. Señalización mediada por el eje PI3K-AKT-GSK-3 β .

El eje de señalización formado por PI3K/AKT1/GSK3 supone la principal vía de señalización intracelular que media la apoptosis celular (Brunet et al., 2001), aunque también existen otras dos vías implicadas pertenecientes a la familia de las MAP-quinasas: la vía de la p38 y la vía de las Jun-quinasas (JNKs).

Esta señalización se inicia con la unión de un ligando a su receptor de membrana y la activación de PI3K (fosfoinositol-3 quinasa), que activa a una quinasa que fosforila a AKT (proteína kinasa B). Esta proteína, presenta en su secuencia un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) que es reconocido por uno de los fosfolípidos generados por PI3K. La interacción entre el dominio PH de AKT y el fosfolípido induce un cambio conformacional en AKT, dejando al descubierto el residuo Thr308, que es fosforilado por PDK-1 (quinasa dependiente de fosfoinositol 1). La activación completa de AKT se lleva a cabo mediante una segunda fosforilación sobre el residuo Ser473, mediada por una proteína aún no identificada, pero que se ha denominado PDK-2. Estudios recientes han relacionado a la quinasa de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) con la fosforilación en este residuo (Zeng et al., 2007; Varma et al., 2008). En consecuencia, la proteína AKT debe fosforilarse en esos dos residuos para que su actividad quinasa sea completamente activada. Sin embargo, es posible que sólo se produzca una de las fosforilaciones, lo que conlleva a una activación parcial de la proteína AKT. El nivel total de fosforilación de AKT es el resultado de la actuación de múltiples kinasas y fosfatasa (Kuo y col., 2008), cuyos mecanismos de acción se entrecruzan para regular a la proteína AKT de forma compleja. Entre las fosfatasa que regulan la actividad de AKT se encuentran PP2a y PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*).

A su vez, AKT puede fosforiar también a varios sustratos, entre ellos la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK3 β) que juega un papel esencial en la enfermedad de Alzheimer. La proteína GSK3 es una Ser/Thr quinasa que presenta dos isoformas: GSK3 α y GSK3 β . Inicialmente fue identificada como una enzima implicada en la fosforilación de la glucógeno sintasa para inhibir la síntesis de glucógeno. Actualmente, se sabe que puede fosforilar gran cantidad de sustratos. Esto hace que GSK3 β participe en mecanismos de señalización celular implicados en el mantenimiento de la estructura celular, metabolismo y apoptosis (Beurel and Jope, 2006). En situaciones fisiológicas, la proteína GSK3 β se expresa de forma constitutiva y está activa, inactivándose por fosforilación de diversas quinasas, principalmente AKT-1, pero también otras como la proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y p90Rsk (Jope and Johnson, 2004).

La activación de GSK-3 β puede formar parte en el proceso de activación de la apoptosis por **vía intrínseca** mediante fosforilación de proteínas de la familia Bcl-2 (Karnoski et al., 2007). En este sentido, las interacciones opuestas entre miembros de la familia Bcl-2 establecen un equilibrio entre los estímulos de señalización pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, que regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial (Cory and Adams, 2002). La integridad de la membrana mitocondrial se altera cuando proteínas como Bim, Bik y Bad se unen a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y neutralizan su acción. Entonces, miembros proapoptóticos como Bax y Bak, forman homo-oligómeros en la membrana mitocondrial (Gross et al., 1998), que pueden inducir la apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (mPTP). La apertura del poro conlleva un descenso en el potencial de membrana y la salida de factores apoptóticos entre los que se incluyen el citocromo c (Susin et al., 1999). El citocromo c en el citosol se une a la proteína Apaf-1, provocando su oligomerización y formando un complejo llamado **apoptosoma**. En presencia de citocromo c y dATP, Apaf-1 se oligomeriza formando este complejo de entre 700 kDa y 1,4 MDa, que recluta y activa la forma zimógeno de procaspasa 9 (PC9). Esta caspasa activa y unida al apoptosoma funciona como un holoenzima que procesa a otras caspasas ejecutoras como las procaspasas 3, 6, y 7 (Rodriguez and Lazebnik, 1999).

GSK-3 β participa en la activación de la apoptosis intrínseca mediante distintos mecanismos. En primer lugar, puede fosforilar a Bax en su Ser163, lo que resulta en su activación y traslocación a la mitocondria, permitiendo la liberación de citocromo c y la formación del apoptosoma. Además, GSK-3 β promueve la expresión inducida por

INTRODUCCIÓN

p53 del gen de Bax, e inhibe la expresión de CREB (*cyclic AMP-responsive element binding protein*), lo que puede bloquear la expresión dependiente de CREB del factor anti-apoptótico Bcl-2. Así mismo, GSK-3 β potencia la degradación de un factor anti-apoptótico de la familia Bcl-2, MCL-1. Por último, GSK3 también fosforila a la proteína tau, participando de esta manera en la disrupción de los microtúbulos que ocurre en la apoptosis (Beurel and Jope, 2006). Finalmente, cabe destacarse que la activación de GSK-3 β facilita, pero no inicia la vía intrínseca de la apoptosis, lo que significa que bajo condiciones fisiológicas, la activación de GSK-3 β no induce la apoptosis celular.

GSK3 también es responsable de la fosforilación de otros sustratos como la proteína β -catenina. La proteína GSK3 β activa, fosforila a β -catenina en cuatro residuos (Ser33, Ser37, Thr41 y Ser45) localizados cerca del extremo N-terminal. Cuando β -catenina está fosforilada es ubiquitinada y degradada por el proteasoma; en cambio cuando está defosforilada se trasloca al núcleo y participa en la regulación de la expresión de genes implicados en la supervivencia celular (Ding et al., 2008). Por lo tanto, la fosforilación y degradación de β -catenina constituye una medida indirecta de la actividad quinasa de GSK-3 β , y de este modo, la hemos empujado en este trabajo.

8. Transporte axonal a través de microtúbulos.

La alteración de transporte a través de microtúbulos supone también una de las causas que inducen la apoptosis celular. Sin embargo, el modo en el que ambos eventos se interconectan es actualmente una incógnita. En este sentido, aunque el proceso de tráfico vesicular en neuronas es muy similar al de otros tipos celulares, existe una importante diferencia debida a la polaridad extrema de estas células nerviosas. Normalmente, los cuerpos neuronales y las terminales sinápticas están separados por una distancia considerable. Por este motivo, estas células requieren de sistemas especiales de transporte de vesículas para llevar la carga desde los cuerpos neuronales hasta las terminales y viceversa.

Existen tres clases de transporte por los que la carga puede moverse a través de los axones: mediante transporte axonal anterógrado rápido, flujo axoplásmico lento y transporte axonal retrogrado rápido. Brevemente, la mayor parte de los compartimentos membranosos recién sintetizados son transportados desde los cuerpos neuronales, a través de los axones, mediante transporte axonal anterógrado rápido hacia las terminales sinápticas. De hecho, una gran proporción de esta carga, consiste en vesículas sinápticas o precursores de las mismas. En las terminales sinápticas, las membranas vesiculares se reciclan constantemente mediante ciclos de

endo-exocitosis que forman parte de los mecanismos de transmisión sináptica. A su vez, estos compartimentos y sus componentes son continuamente reemplazados por otros nuevos que llegan desde los cuerpos. De la misma manera, las membranas de las vesículas inicialmente presentes en las terminales son de nuevo transportadas hacia los cuerpos donde tiene lugar su degradación o reciclaje (Hirokawa, 1993; De Vos et al., 2008; Nixon, 2007).

- **Transporte axonal rápido:** Como hemos comentado anteriormente, está implicado en el transporte de vesículas. Esta carga se transporta de modo saltatorio (*stop-and-go*) de forma bidireccional (anterógrado y retrógrado). Este tipo de transporte está basado en microtúbulos que actúan como raíles a través de los cuales se produce el movimiento saltatorio de las vesículas a través de los axones. En este sentido, existen varias ATPasas implicadas en el transporte de la carga: la proteína motora kinesina-1 implicada en el transporte anterógrado, y la proteína motora dineina-1 implicada en el transporte retrogrado. Kinesina-1 es una holoenzima formada por dos cadenas pesadas (α) que presentan un dominio de unión a microtúbulos donde se encuentra la actividad ATPasa, y dos ligeras (β) que se unen a la carga y regulan la actividad motora. La proteína al completo ($\alpha_2\beta_2$) tiene un peso molecular aproximado de 270 KDa (ver figura I5).

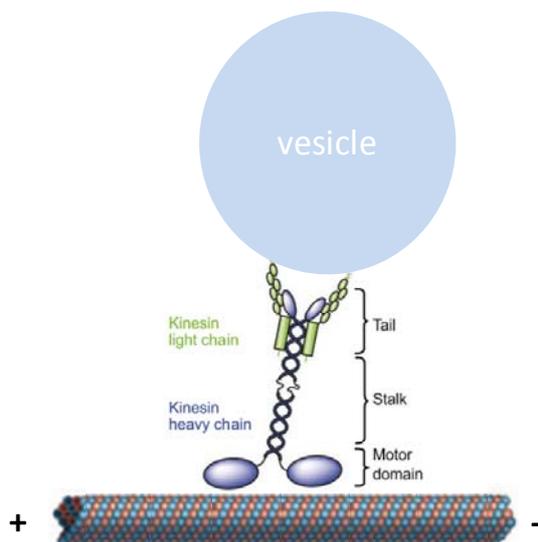


Figura I5. Esquema representativo de la proteína motora kinesina-1. Kinesina-1 está formada por dos cadenas pesadas que portan un dominio de unión a microtúbulos y por dos cadenas ligeras que unen la carga vesicular transportada. Adaptado de De Vos et al., 2008.

- **Transporte axonal lento:** Mientras que los orgánulos celulares son transportados mediante un transporte rápido, los componentes del citoesqueleto y las proteínas solubles de citosol se transportan mediante **flujo**

INTRODUCCIÓN

axoplásmico lento. Las proteínas preferentemente transportadas por este sistema son las subunidades que forman los neurofilamentos y la actinas.

Por otro lado, las proteínas que forman el citoesqueleto neuronal median el movimiento de orgánulos desde una región celular hasta otra y sirven como puntos de anclaje para las vesículas, por ejemplo, a través de receptores de membrana de la superficie vesicular. Además, los constituyentes del citoesqueleto son responsables de la estructura celular y axonal. De hecho, la organización del citoesqueleto es determinante en el funcionamiento correcto del transporte axonal y se encuentra alterado en patologías neurodegenerativas como la AD. Tres tipos de elementos fibrilares son los principales constituyentes del citoesqueleto neuronal: microtúbulos, neurofilamentos y microfilamentos, junto con proteínas asociadas.

Por un lado, los **microtúbulos** son los filamentos más gruesos del citoesqueleto (25-28 nm de diámetro) y están constituidos normalmente por 13 protofilamentos que a su vez están formados por dímeros de α - y β -tubulina. Los microtúbulos se encuentran organizados longitudinalmente en los axones con su polaridad orientada siempre en la misma dirección. Esta organización es probablemente determinante para la especificidad direccional de las proteínas motoras kinesina y dineina. Además, los microtúbulos llevan asociadas las proteínas MAP-1, MAP-2 y tau (MAPs: *microtubule-associated proteins*) que regulan la estabilidad y la polimerización/ensamblaje en una única dirección a lo largo del axón. Mientras MAP-1 y tau se concentran en los axones, MAP-2 es más abundante en los cuerpos neuronales y las dendritas. Al igual que tau, MAP-1 y MAP-2 también son sustratos de quinasas y fosfatasas que regulan su actividad, de forma que la hiperfosforilación de estas proteínas llevan a su desestabilización y desacoplamiento de los microtúbulos. En este sentido, la hiperfosforilación de la proteína tau es uno de los rasgos neuropatológicos de la AD (ver apartado 2.2 de esta introducción). De hecho, una de las teorías actuales con respecto a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer es que esta patología tiene lugar como consecuencia de la alteración en el citoesqueleto debido a la hiperfosforilación de tau, lo que llevaría a la muerte neuronal y a la aparición de ovillos neurofibrilares (Gotz, 2001; Spires-Jones et al., 2009).

Por otro lado, los **neurofilamentos**, o filamentos intermedios en otros tipos celulares (10 nm de diámetro), son las estructuras más abundantes en los axones y los principales responsables de la estructura axonal. Los neurofilamentos son polímeros formados por 3 subunidades distintas: NF-L (*light*), NF-M (*medium*) and NF-

H (*heavy*). Al igual que los microtúbulos están orientados longitudinalmente en los axones y son unas diez veces más abundantes. El ensamblaje de las 3 subunidades para formar el heteropolímero está fuertemente regulado por la fosforilación de las subunidades tanto en el extremo amino-, como carboxilo-terminal, de tal forma, que NF-L, NF-M y NF-H presentan 3-5, 15-26 o 30-60 grupos fosfato/molécula respectivamente. De hecho, mientras que la fosforilación de los monómeros en el extremo N-terminal inhibe la polimerización, la fosforilación del extremo C-terminal, a su vez regulada por la que tiene lugar en N-terminal, induce la polimerización de las subunidades para formar los neurofilamentos. Actualmente se cree que la fosforilación en C-terminal podría inducir la interacción de las subunidades transportadas en los axones con los componentes de los microtúbulos, promoviéndose así su integración en el citoesqueleto y la estabilidad axonal (Sihag et al., 2007).

Finalmente, los **microfilamentos** (3-5 nm de diámetro) constituyen polímeros de actina con polaridad y están organizados en una doble hélice. Están presentes en todos los tipos celulares y son los componentes estructurales más abundantes en la célula. Aparecen asociados a la membrana plasmática a través de otras moléculas, y a diferencia de los anteriores están concentrados en dendritas y cuerpos neuronales más que en axones.

Desde el punto de vista de la enfermedad de Alzheimer, tanto los ovillos neurofibrilares como los depósitos de β -amiloide extracelulares son rasgos neuropatológicos de la enfermedad. En este sentido, mientras que los ovillos contienen una proteína asociada a microtúbulos, la proteína tau hiperfosforilada, como principal componente, las placas de $A\beta$ son áreas rodeadas por neuritas distróficas que acumulan vesículas. Por lo tanto, ambos rasgos patológicos ponen en evidencia las deficiencias de transporte axonal que acontecen en la AD. De hecho, en los modelos animales que expresan formas mutadas de APP o PS1, empleados para el estudio de esta enfermedad también se han puesto de manifiesto defectos en el transporte axonal. Sin embargo, los mecanismos que median la expresión de estas mutaciones con la aparición de las deficiencias axonales, y a su vez éstas con la degeneración neuronal progresiva propia de la enfermedad es una incógnita, aunque actualmente se piensa que el péptido $A\beta$ podría jugar un papel central (De Vos et al., 2008).

9. Ruta autofágica.

La habilidad de la ruta autofágica en la degradación de componentes celulares forma parte del control de calidad de proteínas de las células. En este control, también participa el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), otro complejo proteolítico fundamental en la degradación de proteínas citosólicas. Ambos sistemas actúan de forma conjunta para mantener el proteoma libre de alteraciones. Cuando estos sistemas no actúan de forma adecuada, se produce la acumulación de proteínas a nivel intracelular y la consecuente formación de agregados tóxicos que pueden comprometer la supervivencia celular.

En mamíferos los componentes intracelulares pueden ser degradados por vía lisosomal según tres vías autofágicas distintas: la macroautofagia, la microautofágica y la autofágica mediada por chaperonas. Las 3 vías tienen en común la etapa de maduración final que acaba en la fusión con lisosomas, pero se diferencian en los sustratos, su regulación y las condiciones bajo las que cada una de ellas es activada (ver figura I6) (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007).

- **Macroautofagia:** Normalmente es denominada como autofagia. Mediante esta vía se degradan componentes del citosol y orgánulos celulares. Esta vía requiere la formación de una doble membrana lipídica que envuelve el contenido que será degradado, y que una vez autosellada da lugar al compartimento que denominamos autofagosoma. Inicialmente este compartimento no contiene enzimas hidrolíticas y requiere la fusión con lisosomas para que se degrade el contenido. La activación de esta vía normalmente ocurre bajo condiciones de estrés y tiene 2 propósitos principales: como fuente de macromoléculas esenciales y energía bajo condiciones de privación de nutrientes; o bien, como un mecanismo de degradación de componentes intracelulares alterados o deficientes. Además, estudios recientes apoyan la hipótesis de que la macroautofagia existe en muchos tipos celulares como un flujo continuo y necesario para mantener la homeostasis celular (por ejemplo, en neuronas). La disfunción de la macroautofagia se ha descrito en multitud de patologías como procesos oncogénicos, infecciones bacterianas o víricas, miopatías severas, enfermedades metabólicas como la diabetes y patologías neurodegenerativas como la AD.

- **Microautofagia:** En esta vía los componentes citosólicos a degradar son directamente incluidos en los lisosomas a través de invaginaciones, y son rápidamente degradados en el lumen del lisosoma. Esta función existe de forma continua en las células y participa en el turnover de los componentes celulares en situaciones fisiológicas.
- **Autofagia mediada por chaperonas (CMA):** Mediante esta vía, moléculas del citosol con un dominio específico para la degradación por vía lisosomal pueden ser reconocidos por chaperonas. Una vez que la chaperona reconoce al sustrato, éste es directamente transportado hasta la superficie de los lisosomas, donde interacciona con un receptor de membrana (LAMP-2), y pasa al interior de la vesícula gracias a la participación de otras chaperonas localizadas en el interior de los lisosomas. Al igual que en el caso anterior, esta vía funciona de forma continua bajo condiciones fisiológicas en la mayor parte de los tejidos, aunque su máxima activación se produce bajo condiciones de estrés. La selectividad de esta vía resulta particularmente útil bajo situaciones que implican la alteración de la estructura nativa de las proteínas (estrés oxidativo, exposición a agentes tóxicos...), debido a que puede eliminar los componentes dañados sin afectar a otras moléculas vecinas.

INTRODUCCIÓN

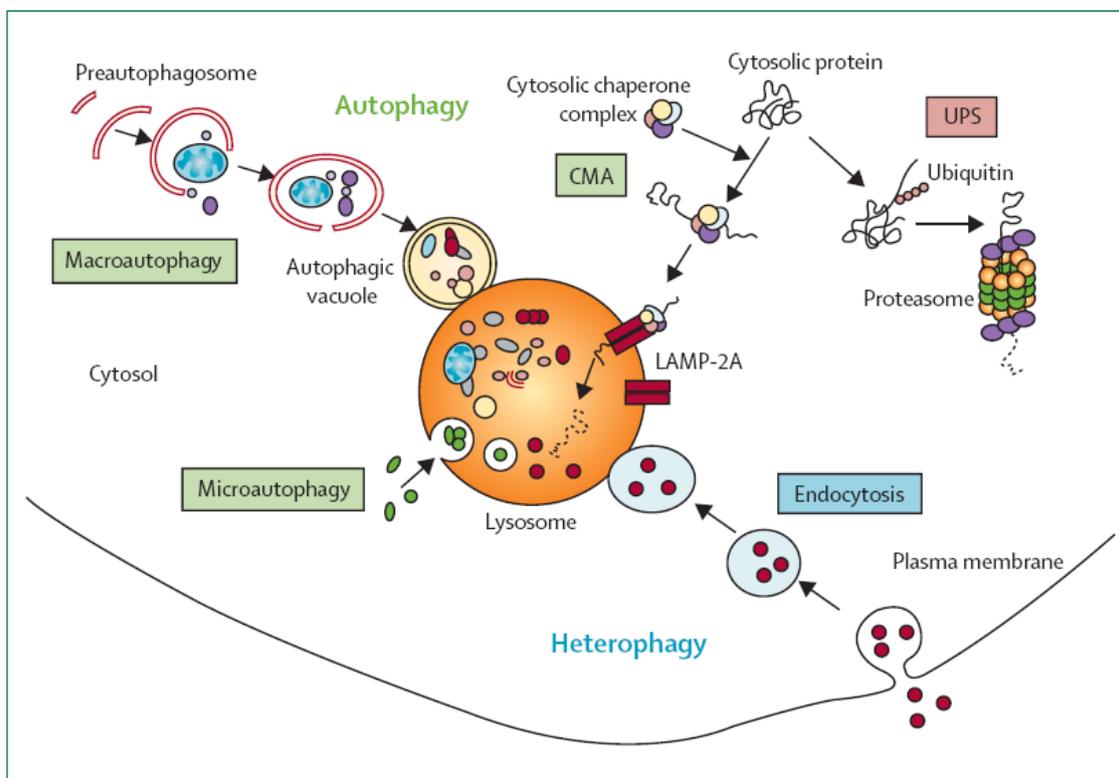


Figura 16. Tipos de autofagia en mamíferos. Las proteínas que son sustratos de los lisosomas pueden proceder del medio extra- (endocitosis) o intracelular (autofagia). En la macroautofagia, los sustratos son secuestrados en un compartimento con doble membrana lipídica cuya membrana externa se fusiona con los lisosomas para la degradación. En microautofagia, los sustratos son directamente internalizados en los lisosomas mediante invaginación de los mismos. Por el contrario, la autofagia mediada por chaperonas es específica de ciertas proteínas que son selectivamente transportadas a la membrana lisosomal por chaperonas para su internalización. Las proteínas citosólicas también pueden ser marcadas por ubiquitina para su degradación en el proteasoma. Adaptado de Martínez-Vicente and Cuervo 2007.

La autofagia (macroautofagia) puede verse incrementada por varios estímulos que inducen estrés celular, como la privación de nutrientes y energía, estrés de retículo endoplásmico, infección por microorganismos patógenos, hipoxia, estrés oxidativo, daño mitocondrial, entre otros. La estimulación de la autofagia por estos estímulos puede implicar varias vías de señalización intracelular que acaban en una misma proteína diana. Una de estas proteínas dianas es mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que participa en la regulación de la autofagia formando un complejo (mTORC1) con otras 4 proteínas: GβL/mLST8, Raptor, Deptor y PRAS40. Al mismo tiempo, mTOR es una proteína altamente regulada mediante fosforilación por multitud de quinasas como AKT-1, MAPK y AMPK (quinasa dependiente de AMP), lo que a su vez regula la actividad del complejo mTORC1 llevando a la inhibición/estimulación de la autofagia (figura 17). Sin embargo, aun no se conoce con exactitud cómo se produce la señalización del complejo mTORC1 para inhibir o estimular la autofagia, aunque recientemente se ha propuesto como posibilidad que la actividad quinasa de mTOR

sobre las proteínas ULK (*Atg1-like kinase*) pueda repercutir en la fosforilación de Ambra-1, que forma parte del complejo formado por beclina-1, y que también participa en la iniciación de la autofagia (Kroemer et al., 2010; He and Levine, 2010).

Beclina-1, al igual que mTOR, forma parte de un complejo multiproteico formado por beclina-1, Vps34, Vps15 y Ambra-1. La formación del complejo parece estar mediada por la activación alostérica de Vps34, una PI3K de clase III, para generar fosfatidil-inositol-3-fosfato, que recluta a otras 2 familias de proteínas (DFCP-1: *doble FYVP domain-containing protein 1* y WIPI: *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*) que participan en la nucleación de los nuevos autofagosomas. A su vez, beclina-1 también está regulada por la interacción con otras proteínas como Atg14 y UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene*). De hecho, recientes evidencias apuntan a que beclina-1 podría formar complejos con otras proteínas como Atg 14 o UVRAG y de este modo participar en otras rutas de tráfico vesicular u otros puntos de la misma ruta autofágica como la fusión con lisosomas (Itakura E. and Mizushima N., 2009; Jaeger et al., 2010; He and Levine, 2010). La familia Bcl-2 también puede interaccionar con beclina-1, regulando su actividad. En este caso, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1 interaccionan negativamente con beclina-1 impidiendo la iniciación de la autofagia (Kroemer et al., 2010).

Por otro lado, en la formación de los autofagosomas propiamente dichos interviene una familia de proteínas denominadas *Atg (autophagy-related genes)*. Actualmente dos complejos distintos son necesarios para la formación de esta estructura, denominada fagóforo. Por un lado, el formado por Atg12 y Atg5, y por otro lado, la formada por Atg8/LC3 y los sistemas para la conjugación de fosfatidiletanolamina. Atg12-Atg5 se encuentran en la formación inicial de la estructura pero desaparecen una vez que el autofagosoma está formado. En este sentido, se ha propuesto que la membrana que forma parte de las vesículas autofágicas podría proceder del retículo endoplásmico, de la membrana externa mitocondrial o de la membrana plasmática. Del mismo modo que Atg5 y Atg12, LC3 (Atg8) también se encuentra en la membrana del fagóforo y participa en la formación del autofagosoma. Sin embargo, la incorporación de LC3 desde el citosol (LC3-I) a la membrana de la vesícula (LC3-II) requiere previamente de la conjugación con fosfatidiletanolamina. En este proceso intervienen Atg3, Atg4 y Atg7 (ver figura 17). Una vez que el autofagosoma ha sido formado, la proteína LC3-II presente en la membrana externa de la vesícula, es deslipidada y reciclada. La eliminación de LC3-II de la superficie de

INTRODUCCIÓN

la vesícula es necesaria para que la vesícula pueda fusionarse con endosomas o lisosomas. Sin embargo, la proteína LC3-II presente en la membrana interna permanece hasta que la vesícula se fusiona con lisosomas, momento en el que es degradada. Por este motivo, LC3-II es el marcador de vesículas autofágicas más utilizado en la mayor parte de los trabajos sobre autofagia, incluida esta tesis. (Eskelinen EL, 2005; Longatti and Tooze, 2009).

Originalmente, los autofagosomas presentan el mismo pH que el citoplasma que los rodea, sin embargo, durante el proceso de maduración estas vesículas se fusionan con otras endo/lisosomales, lo que hace que el pH se acidifique gradualmente. Posiblemente, la acidificación comienza antes de la liberación de las enzimas hidrolíticas lisosomales al interior de las vesículas autofágicas, debido a que la fusión con otras vesículas les confiere nuevas proteínas de membrana y bombas de protones que pueden inducir este ambiente ácido en el interior de la vesícula. Finalmente, la fusión con los lisosomas es un proceso complejo mediado por muchas proteínas reguladoras como la ATPasa SKD1, proteínas SNARES como Vti-1, proteínas de unión a GTP como Rab7, o el receptor de membrana de los lisosomas LAMP2. La deficiencia en cualquiera de ellos induce la acumulación de vesículas debido a una ineficiente fusión con los lisosomas. Recientemente, la proteína presenilina-1 ha sido incluida en este evento, debido a que su deficiencia en cultivos celulares y modelos de la enfermedad induce la acumulación de vesículas autofágicas con proteínas que normalmente son degradadas vía lisosomal como la telencefalina (Eskelinen EL, 2005; Esselens et al., 2004).

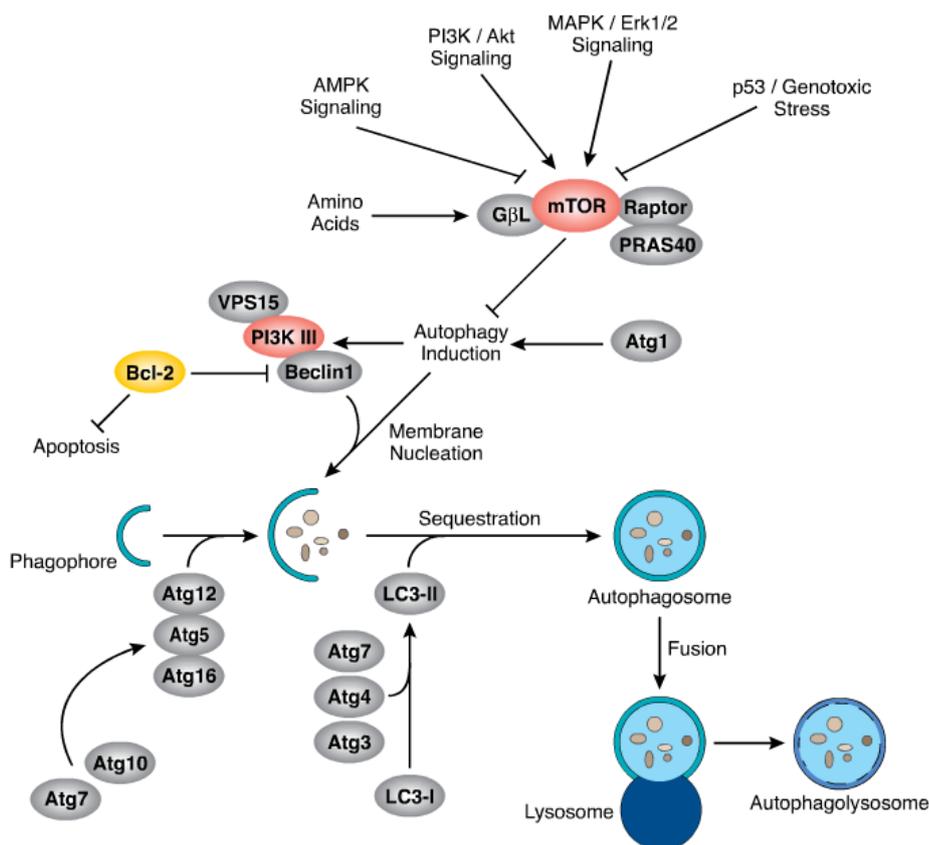


Figura 17. Esquema representativo de la formación de los autofagosomas. Varias proteínas pueden regular la estimulación de la autofagia, entre ellas, los complejos formados por beclina-1 o mTOR. La formación de las vesículas autofágicas está regulada por las proteínas Atg. La incorporación de LC3 a la membrana de la vesícula requiere una lipidación previa, en la que también participan las proteínas Atg. Adaptado de Cell signaling corp.

Finalmente, y en lo que respecta a la AD, ya hemos mencionado anteriormente que los enfermos presentan acumulación de vesículas autofágicas en distrofias axonales en torno a los depósitos de A β . Este fenómeno también se ha observado en un modelo de la enfermedad que expresa PS1 y APP (igual que el nuestro), que también acumula A β en dichas vesículas, lo que sugiere que el procesamiento amiloidogénico podría tener lugar en estas vesículas acumuladas (Yu et al., 2004; Yu et al., 2005). En este sentido, los enfermos también presentan una regulación al alza en los componentes de los lisosomas, lo que sugiere que la degradación por esta vía podría estar incrementada en la enfermedad (Cataldo et al., 1995; Cataldo et al., 1997). Sin embargo, tanto vesículas autofágicas, como el péptido A β , que se puede degradar por vía lisosomal, se acumulan en los enfermos (Nixon et al., 2005; Yang et al., 2011). Estas evidencias sugieren una deficiencia en la maduración final de estas vesículas en los enfermos de AD. En este sentido, la implicación de PS1 en el proceso de maduración de estas vesículas podría ser fundamental para explicar este proceso,

INTRODUCCIÓN

al menos en los enfermos con AD familiar. Recientemente, se ha demostrado que presenilina-1 participa en la maduración de una subunidad reguladora de la bomba de protones lisosomal (V0a1), lo que permite especular con la posibilidad de que las mutaciones en presenilina puedan inducir una insuficiente maduración de las vesículas autofágicas (Eskelinen EL, 2005).

C. OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVOS DEL TRABAJO

1. Identificación de la presencia de péptido β -amiloide soluble en el medio extracelular y caracterización de las posibles formas oligoméricas presentes en un modelo murino PS1_{M146L}xAPP_{751-SL} de la enfermedad de Alzheimer durante el proceso de envejecimiento del animal.
2. Determinación de la capacidad de las formas oligoméricas de A β para interrumpir las vías de señalización mediadas por neurotrofinas.
 - 2.1 Estudio de la implicación del péptido APP α soluble en la fosforilación de GSK-3 β a través de los receptores de insulina e IGF-1 y de la vía PI3K-AKT-GSK-3 β .
 - 2.2 Estudio del efecto de las formas oligoméricas de A β en la inhibición de la fosforilación de fosforilación de GSK-3 β a través de los receptores de insulina e IGF-1 y de la vía PI3K-AKT-GSK-3 β .
3. Estudio de los mecanismos moleculares y celulares posiblemente implicados en un incremento de la concentración de formas oligoméricas de A β durante el proceso de envejecimiento en los animales PS1xAPP.
 - 3.1 Estudio del procesamiento de la proteína APP y de las enzimas implicadas en la ruta de producción del β -amiloide.
 - 3.2 Estudio de la implicación de los dominios de membrana del tipo *Raft* lipídicos en el procesamiento de APP.
 - 3.3 Identificación de las evidencias celulares y bioquímicas asociadas a la alteración en los sistemas de transporte vesicular a nivel axonal.
 - 3.4 Estudio de la acumulación de los precursores del β -amiloide en vesículas autofágicas y de las deficiencias en la degradación de las proteínas acumuladas por vía lisosomal.
 - 3.5 Estudio de la acumulación del péptido β -amiloide en sinaptosomas como posible origen de los oligómeros solubles de A β .
 - 3.6 Estudio de las formas oligoméricas de A β presentes en las placas, como posible fuente de oligómeros solubles de A β .

D. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.

Para el desarrollo de este trabajo hemos utilizado ratones machos de fondo genético puro de 2, 6, 12, 18 y eventualmente hasta 21 meses de edad:

a) **Ratones transgénicos PS1xAPP:**

PS1 (M146L) x APP (751-SL): Modelo de enfermedad de Alzheimer mayoritariamente empleado en este trabajo y suministrado por *Sanofi-Aventis Pharma*. Se caracteriza por expresar la forma mutada de la Presenilina-1 humana (PS1) Met 146 Leu bajo el dominio del promotor de la hidroximetilglutaril-CoA(HMG-CoA) reductasa; y la forma mutada de la isoforma de 751 aminoácidos de la proteína precursora del β -amiloide humano (APP) con dos mutaciones: *Swedish* (Lys-Met 670/671 Asn-Leu) y *London* (Val 717 Leu) bajo el dominio del promotor Thy1. Puesto que la expresión del APP transgénico está bajo el control del promotor Thy1, esta proteína sólo se expresa en neuronas, y no en células gliales. Los ratones transgénicos se obtienen cruzando ratones homocigotos PS1 con heterocigotos APP. Todos los animales se mantienen en un fondo genético puro, C57BL/6.

PS1 (Δ exon9) x APP (695-S): Modelo de enfermedad de Alzheimer suministrado por *Jackson Laboratories* que hemos empleado eventualmente y como apoyo a los resultados obtenidos con el modelo anterior. Se caracteriza por expresar la forma mutada de la Presenilina-1 humana (PS1) carente del exón número 9, y la forma mutada de la isoforma de 695 aminoácidos de la proteína APP con la mutación *Swedish* (Lys-Met 670/671 Asn-Leu), ambos bajo el dominio del promotor de la proteína priónica PrP. Al igual que los anteriores, estos ratones también poseen un fondo genético puro C57BL/6.

b) **Ratones controles *wild-type*:** Ratones del mismo fondo genético que los anteriores (C57BL/6) no modificados genéticamente y de las mismas edades.

Todos los animales han sido mantenidos en el estabulario de la Universidad de Sevilla antes de su sacrificio, sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, bajo condiciones apropiadas de humedad y temperatura (20-25°C), y con acceso libre a agua y alimento (*dieta de mantenimiento A.04 de Panlab S.L.*). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/EU), siguiendo la normativa española (BOE 252/34367-91, 2005) para el uso de animales de experimentación.

2. Disección de los centros cerebrales de interés.

Durante el sacrificio, la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con las normas del comité ético de la Universidad de Sevilla.

Para la disección de los hipocampos y las cortezas, los animales fueron decapitados tras inyección letal con hidrato de cloral (*Scharlau*) al 6% en cloruro sódico (*Merck*) al 0,9%

MATERIALES Y MÉTODOS

(p/v) administrado intra-peritonealmente. Las regiones cerebrales elegidas fueron diseccionadas, congeladas en Nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C hasta su uso.

3. Aislamiento de RNA y proteínas a partir de centros de cerebro.

3.1 Reactivos

- Tripure® (Roche).
- Cloroformo (Sigma).
- Isopropanol (Sigma).
- Etanol absoluto (Merck).
- Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma) al 0.1% (p/v).
- Solución de guanidina (Sigma) 0.3M en etanol al 95% (v/v).
- Solución 4% SDS (Applichem), 8M Urea (Panreac), en 40mM Tris-HCl pH 7.5.
- Geles de Agarosa (Ecogen) al 2% y bromuro de etidio (Bio-Rad) 0.5 $\mu\text{g/ml}$ en TBE (90mM ácido bórico, 2.5mM EDTA en 90mM Tris).

3.2 Fundamento

El método empleado se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (RNA, DNA, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). El proceso comienza con la homogenización del tejido y rotura de las células en presencia de tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que rompe las membranas y desnaturaliza las proteínas, incluyendo proteasas, DNAasas y RNAasas. Estas últimas son muy resistentes a la mayoría de agentes físicos, incluso al autoclavado, pero se inactivan en presencia de isotiocianato de guanidina 4M. Tras añadir cloroformo y centrifugar la solución, aparecen tres fases. La fase superior es acuosa, donde está presente el RNA, mientras que las proteínas y DNA se encuentran en la interfase y fase orgánica, respectivamente.

3.3 Aislamiento de RNA

Una vez extraída la fase superior acuosa de la solución trifásica creada tras la adición de cloroformo al homogenado del tejido en tripure, el RNA se recupera por precipitación con isopropanol, que disminuye la polaridad del medio e insolubiliza el RNA.

Es importante que tanto reactivos como material de trabajo estén libres de RNAasas, por lo que rutinariamente optamos por tratar el agua con DEPC a una concentración del 0.1% (p/v) (Fedorcsak I and Ehrenberg L., 1966), y posteriormente la autoclavamos para eliminar el DEPC, ya que este puede inactivar el RNA por carboximetilación. Todos los reactivos y material fungible de origen comercial utilizados durante este proceso se adquieren libres de RNAasas, y el material físico no fungible (como pinzas o tijeras) se autoclava antes de su uso.

El RNA se purificó de forma automatizada utilizando el sistema *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems), que permite purificar hasta 96 muestras simultáneamente, y que proporciona gran rendimiento y pureza (1.2-1.5 mg RNA/mg tejido),

además de una baja contaminación por DNA y/o proteínas. Este sistema consiste en una bomba de vacío que aspira el contenido de las muestras haciéndolo pasar por unos filtros donde queda retenido el RNA previamente precipitado con isopropanol. Finalmente, el RNA retenido se eluye de estos filtros con agua libre de RNAasas. El uso de este equipo es una gran ventaja para nuestro trabajo de laboratorio, dado la pequeña cantidad de material de partida, así como el número de muestras que fue necesario procesar.

3.3.1 Procedimiento

En primer lugar, las áreas cerebrales objeto de estudio (hipocampos o cortezas) procedentes de nuestros animales controles o transgénicos se extraen de los tubos donde se encontraban conservados a -80°C . A continuación, se pesan en balanza de precisión y se pasan a un tubo con capacidad para 2 ml esterilizado en autoclave.

El proceso comienza añadiendo 1 ml del reactivo *Tripure*® por cada 50-100 mg de tejido. A continuación, se procede a la homogenización de la muestra con polytron durante 15 segundos. El homogenado se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de los complejos núcleo-proteínas, y posteriormente se añaden 0.2 ml de cloroformo por ml inicial de *Tripure*® añadido. Esta mezcla se agita fuertemente y de nuevo se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se centrifuga a $12000\times g$ a 4°C durante 15 minutos, obteniéndose una solución que contiene tres fases: la fase superior acuosa donde está el RNA, la interfase intermedia con el DNA, y la fase inferior que contiene las proteínas. Una vez extraída la fase superior, el RNA se recupera por precipitación con isopropanol (0,5 ml de isopropanol por mililitro inicial de *Tripure*® añadido). Posteriormente se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos para favorecer la precipitación. Por último, purificamos el RNA precipitado haciendo uso del sistema *ABI Prism 6100*.

La purificación y recuperación del RNA utilizando este sigue los pasos que se resumen en la tabla M1.

El RNA así purificado se cuantifica en un espectrofotómetro, aprovechando la capacidad de las bases nitrogenadas de absorber a una longitud de onda de 260 nm. Además, también determinamos la razón de absorbancias A_{260}/A_{280} (longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos), lo que nos permite conocer el nivel de contaminación por proteínas en el RNA purificado. Una razón de 2.1 indica que la muestra de RNA no presenta prácticamente contaminación con proteínas.

Una vez se ha purificado, cuantificado y comprobado su integridad, el RNA se almacena a -80°C hasta su posterior uso.

MATERIALES Y MÉTODOS

PASO	DESCRIPCIÓN ACCIÓN	VOLUMEN REACTIVO	TIEMPO INCUBACIÓN	APLICACIÓN VACÍO	POSICIÓN PLACA
-	Humedecer pocillos con agua tratada con DEPC	40 µl	-	-	-
1	Cargar muestras	0.5 ml	180 s	80%	Desechar
2	Añadir etanol absoluto 4°C	0.5 ml	180 s	80%	Desechar
3	Añadir etanol absoluto 4°C	0.4 ml	180 s	80%	Desechar
4	Añadir etanol absoluto 4°C	0.3 ml	120 s	60%	Desechar
5	Añadir etanol absoluto 4°C	0.3 ml	120 s	60%	Desechar
6	Aplicar vacío pre-elución	-	300 s	90%	Desechar
7	Suave agitación de la placa	-	-	-	Desechar
8	Eluir con agua tratada con DEPC	150 µl	120 s	40%	Eluir
9	Suave agitación de la placa	-	-	-	Eluir

Tabla M1. Programa para la purificación de RNA empleando el sistema *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems)*.

3.3.2 Comprobación de la integridad del RNA purificado

Para comprobar la integridad del RNA purificado, hemos sometido las muestras de RNA a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Las bandas se visualizan posteriormente en un transiluminador, donde debemos observar dos bandas de alto peso molecular correspondientes al RNA ribosómico 28S y 18S, un conjunto de bandas no discretas a lo largo de todo el carril correspondiente a los diferentes RNA mensajeros, cada uno con su tamaño característico, y dos bandas de menor intensidad y peso molecular correspondientes al RNA transferente y RNA ribosómico 5S (figura M1). Cuando no se observa este patrón, suele aparecer un rastro sin bandas definidas, lo que es indicativo de la degradación del RNA aislado. Aquellas muestras que no pasaron nuestro control de calidad, fueron desechadas y no se emplearon para retrotranscripción.

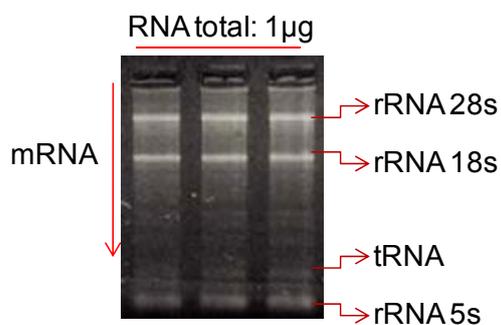


Figura M1. Comprobación de la integridad del RNA en gel de agarosa. Un microgramo de RNA total es suficiente para observar el patrón de bandas definidas por RNA ribosómicos y transferente, así como el conjunto de bandas discretas que forman los RNA mensajeros.

3.4 Aislamiento de proteínas totales

A partir de la interfase y la fase orgánica obtenidas en el proceso de homogenización con el reactivo *Tripure®*, procedemos a extraer las proteínas totales. Estas proteínas están desnaturalizadas y las utilizamos exclusivamente para estudios de western-blot.

3.4.1 Procedimiento

En primer lugar se lleva a cabo la precipitación del DNA para evitar la contaminación de la muestra de proteínas. Para ello, se añade etanol al 100% (0.3 ml de etanol por cada ml de

usado de reactivo *Tripure*®. Se tapa el tubo y se invierte varias veces para mezclarlo. Después, se incuba la muestra durante 2-3 minutos a temperatura ambiente para permitir que el DNA precipite. Se centrifuga la muestra a 2000 xg durante 5 minutos a 4°C, se retira el sobrenadante (donde están las proteínas) y se pasan a un tubo nuevo. A continuación, las proteínas se precipitan con isopropanol (1.5 ml de isopropanol por cada ml de reactivo *Tripure*®), se agita invirtiendo el tubo varias veces, se incuba 10-15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugan 10 minutos a 12000 xg a 4°C. El precipitado de proteínas se lava con 0.3M guanidina en 95% (v/v) etanol (2 ml de guanidina por cada ml de reactivo *Tripure*® inicial) se agita fuertemente y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Este proceso se repite dos veces más y luego se realiza un último lavado con 2 ml de etanol absoluto, para eliminar los restos de guanidina. Finalmente, se deja secar el precipitado a 37°C hasta que se evapore todo el alcohol.

Para solubilizar las proteínas, el precipitado se resuspende en urea 8M-SDS 4% tamponado con Tris-HCl pH7.5. Para ello, se adiciona 500 µl de este tampón por cada mililitro inicial de *Tripure*® utilizado y se incuba toda la noche en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual se procede a la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Lowry. Las proteínas solubilizadas se congelan en diferentes alícuotas a -40°C hasta su uso.

4. Retrotranscripción.

4.1 Reactivos

- Agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) (Sigma) al 0.1% (p/v).
- Kit de retrotranscripción: *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems).

4.2 Fundamento

El RNA es una biomolécula muy inestable debido a la alta afinidad que tienen las RNAasas por este sustrato. Por este motivo, es preferible trabajar con cDNA (DNA complementario al RNA) en lugar del propio RNA. Este cDNA se genera gracias a la enzima transcriptasa inversa, que sintetiza una hebra de DNA complementaria a un molde de RNA en presencia de un cebador complementario. La selección de estos cebadores se realiza en función del RNA que se desee retrotranscribir. De forma general, se pueden emplear tres tipos de cebadores: los random primers (pd(N)₆), oligo(dT) y cebadores específicos (ver figura M2).

- Los **cebadores específicos** son secuencias específicamente diseñadas para la retrotranscripción de un RNA diana que codifica para una determinada proteína.
- Los **oligo(dT)** son secuencias de 10-15 timinas que se aparean con la cola de poliadenina que presentan la mayoría de los RNA mensajeros de las células eucariotas en su extremo 3', por lo que se usa para la retrotranscripción exclusivamente del RNA mensajero.
- Los **random primers o pd(N)₆**, son mezclas de cebadores de 6 nucleótidos que presentan combinaciones aleatorias en sus nucleótidos. Esta variante de cebadores gracias a su

MATERIALES Y MÉTODOS

corta longitud y su alta diversidad en combinaciones de nucleótidos presentan una alta probabilidad de que una parte de ellos puedan unirse al RNA en diferentes regiones, por lo que se utilizan para conseguir una retrotranscripción de RNA total. Estos han sido los cebadores de elección en todas las retrotranscripciones realizadas durante el transcurso de este trabajo.

Después de la retrotranscripción obtenemos un híbrido RNA-DNA que por degradación del RNA quedará finalmente como DNA monocatenario.



Figura M2. Esquema ilustrativo de la unión de los diferentes tipos de cebadores que se pueden utilizar en retrotranscripción a la hebra de RNA.

4.3 Procedimiento

En este trabajo, hemos empleado un kit de retrotranscripción suministrado por *Applied Biosystems* que viene provisto de *Random primers*, y por lo tanto lo empleamos para obtener una retrotranscripción de RNA total. La combinación de los reactivos del kit da lugar a una mezcla de reacción 2X que se mezcla con la muestra en una proporción 1:1 para llevar a cabo la retrotranscripción (ver tabla M2).

Reactivos	Concentración final
Tampón RT 10X	2X
Random Primers 10X	2X
Mezcla Deoxinucleótidos 25X	2X
MultiScribe RT (500U/ul)	5U/ul
Agua tratada con DEPC	Hasta 50µl/reacción

Tabla M2. Relación de los reactivos suministrados por *Applied Biosystems* y concentración final de los mismos para la reacción de retrotranscripción.

Una vez preparada la mezcla de reacción 2X, preparamos 4 µg de RNA de las muestras problemáticas en un volumen final de 50 µl de agua tratada con DEPC. A continuación, se

desnaturaliza el RNA durante 10 minutos a 65°C, y se enfría el RNA desnaturalizado en hielo para evitar la re-naturalización. Finalmente, añadimos 50 µl de la mezcla de reacción 2X a cada tubo de reacción, y se lleva al termociclador para efectuar un ciclo de temperatura a 25°C durante 10 minutos, seguido de 2 horas a 37°C, y un calentamiento final a 85°C durante 30 segundos para favorecer la degradación de las hebras de RNA. El cDNA así obtenido se conserva a -40°C hasta su utilización.

Con el fin de comprobar que la cantidad de cDNA obtenida tras la reacción de retrotranscripción es la misma en todas las muestras objeto de estudio, hemos llevado a cabo la amplificación de un **gen housekeeper (GAPDH)** y comparado los niveles de este gen en todas ellas. Normalmente hemos obtenido la misma expresión de este gen con poca variabilidad en todas las muestras independientemente de su origen. En cualquier caso, la expresión de este gen también se ha empleado rutinariamente como control interno en todos nuestros experimentos con la finalidad de normalizar posibles cambios en la cantidad de cDNA de partida en las reacciones de PCR.

5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

5.1 Reactivos

- *Taqman® Universal PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems)
- *FastStart SYBR-Green® Master Mix 2X* (Roche)
- *Taqman Gene Expression Assay® Mix 20X* (Applied Biosystems)
- Cebadores específicos (Sentido/Antisentido) (Sigma) 10µM
- Agua destilada y autoclavada.

5.2 Fundamento de la amplificación por PCR a tiempo real

En las técnicas convencionales de PCR el análisis de los productos obtenidos se realiza una vez que ha finalizado el proceso de amplificación, normalmente mediante una electroforesis en geles de agarosa, que nos permiten evaluar el tamaño y la pureza de los productos obtenidos. Por ello, a estas técnicas convencionales de PCR se las denomina determinaciones en el punto final. Sin embargo, en la PCR a tiempo real el análisis de los productos amplificados se produce durante la misma reacción, monitorizando una señal fluorescente asociada al producto de PCR. Para ello, utilizamos termocicladores que son capaces detectar la fluorescencia en el transcurso de la reacción. Nosotros hemos utilizado en este trabajo dos termocicladores de este tipo: *ABI 7000 Sequence Detection System* y *ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Desafortunadamente, la mayoría de los reactivos empleados para el desarrollo de esta metodología son mezclas comerciales, de las que el fabricante no detalla explícitamente componentes y concentraciones. Este es el caso tanto de *Taqman® Universal PCR Master Mix 2X* como de *FastStart SYBR-Green® Master Mix 2X*. Ambos tienen todos los componentes básicos necesarios para el desarrollo de la PCR a tiempo real: DNA-polimerasa termoestable,

MATERIALES Y MÉTODOS

deoxinucleótidos trifosfato y cationes mono y divalentes en solución tamponada. Con la salvedad de que *FastStart SYBR-Green® Master Mix 2X* además incluye el colorante fluorescente SYBR-green I. Sobre estos reactivos de base se añaden el resto de componentes necesarios y la muestra para llevar a cabo la PCR.

Durante el transcurso de este trabajo hemos empleado dos métodos para asociar el producto de PCR específico amplificado a una señal fluorescente:

Uno de ellos consiste en el uso de cebadores específicos junto con el fluoróforo de unión al DNA bicatenario **SYBR-green I**. Este fluoróforo emite poca fluorescencia mientras está en solución (no unido al DNA) o cuando el DNA se encuentra desnaturalizado (monocatenario). Sin embargo, durante la etapa de elongación, cantidades crecientes del mismo se intercalan en la doble cadena de DNA que se está sintetizando llevando a un aumento de la fluorescencia de hasta 100 veces. Por lo tanto, debido a las características de este fluoróforo, la lectura de la fluorescencia emitida debe hacerse al final de la etapa de elongación en cada ciclo de PCR (figura M3). El incremento de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida por SYBR-green I. El complejo resultante DNA-SYBR Green I presenta absorción a una longitud de onda (λ) de 497 nm y un pico de emisión a 520 nm (correspondiente a la zona verde del espectro, de ahí su nombre).

El principal inconveniente de este tipo de fluoróforos es su inespecificidad puesto que se unen de manera indiscriminada a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores (cualquier fragmento de DNA bicatenario). Con la finalidad de minimizar estos problemas se deben emplear condiciones de reacción óptimas y cebadores diseñados para ser lo más específicos posible para la diana que se desea amplificar y evitar en la medida de lo posible que sean complementarios entre sí. Por otra parte, también es recomendable iniciar la reacción de síntesis de DNA a temperaturas elevadas (*hot-start PCR*), lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas.

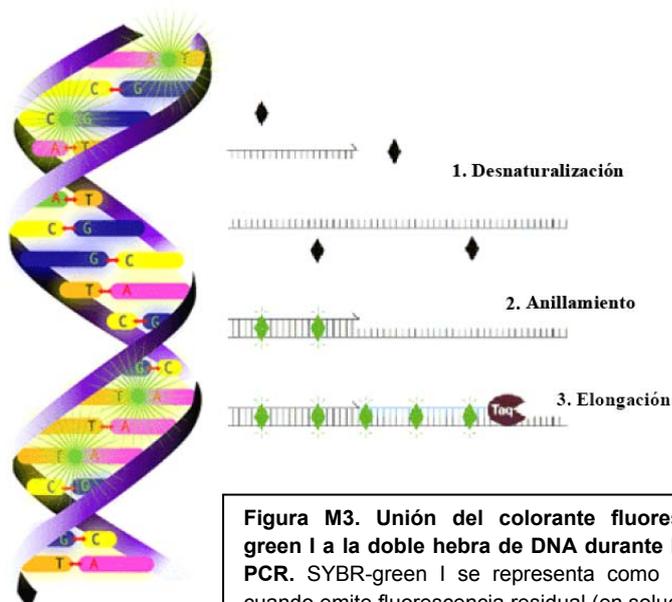


Figura M3. Unión del colorante fluorescente SYBR-green I a la doble hebra de DNA durante las fases de la PCR. SYBR-green I se representa como rombos negros cuando emite fluorescencia residual (en solución) y en verde cuando emite su máxima intensidad de fluorescencia (unido al DNA bicatenario).

Diseño apropiado de los cebadores que usar junto con SYBR-green I. En primer lugar, obtenemos la secuencia del gen de estudio en PubMed.gov (*U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). La secuencia obtenida se introduce en el programa informático *Primer Express v2.0* (Applied Biosystems) que nos permite escoger entre las mejores opciones de pares de cebadores posibles, optimizados para PCR a tiempo real. Las parejas de cebadores empleadas en este trabajo se describen en la tabla M3. Para la amplificación de un segmento del gen objeto de estudio, el diseño de cebadores se hace siguiendo los siguientes principios generales:

- El contenido C+G debe estar entre 40-60%, con una distribución de las cuatro bases a lo largo de la longitud del cebador, evitando regiones polipurínicas o polipirimidínicas.
- Los cebadores deben estar diseñados para ser complementarios en las uniones entre exones del RNA mensajero maduro (o el cDNA correspondiente), para evitar la amplificación a partir la forma inmadura del mRNA o del DNA genómico.
- La longitud del cebador debe ser de 18-25 nucleótidos. Menor longitud puede dar problemas de inespecificidad y mayor longitud no mejora la eficiencia. Para cada par de cebadores su longitud no debería diferir en más de 3 pares de bases.
- Los cebadores no deben contener secuencias palindrómicas ni autocomplementarias de más de 3 pares de bases de longitud. Estas últimas tienden a formar horquillas, lo que podría evitar la unión del cebador a la secuencia de interés.
- No debe existir complementariedad entre el par de cebadores diseñados.
- Los valores de T_m calculados para cada cebador no deben diferir en más de 5°C entre ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- g) La naturaleza del extremo 3' del cebador es crucial, siendo recomendable que comience en C o G.

Gen Diana	Secuencia Oligos 5'→3' (Sentido/Antisentido)	Concentración en la reacción	Referencia de acceso al gen
Transgen APP humano	GGATATGAAGTTCATCATCA	300nM	x06989
	TCACTGTCGCTATGACAACA	300nM	
Transgen PS1 humano	TGGCTCATCTTGGCTGTG	300nM	L76517
	ACCAGCATACGAAGTGG	300nM	

Tabla M3. Relación de las parejas de cebadores empleadas en el desarrollo de este trabajo.

Por otra parte, la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de hibridación (T_m) de los fragmentos amplificados durante la PCR en un proceso denominado **curva de disociación**. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y del porcentaje en G+C. Esta aplicación nos permite comprobar por un lado la especificidad de la reacción, permitiéndonos conocer si la reacción de amplificación dio lugar a un solo producto o a más de uno; mientras por otra parte, nos permite calcular la T_m del o los fragmentos de DNA amplificados, lo que finalmente nos permite conocer, en lo que se refiere a la temperatura de hibridación, si el producto amplificado obtenido coincide con el deseado. Este método consiste en someter el producto de PCR formado a un calentamiento progresivo desde 50°C hasta 95°C, mientras simultáneamente se monitoriza la fluorescencia emitida por SYBR-green I. Cuando la temperatura alcanzada coincide con la T_m de la secuencia amplificada, las copias generadas de la diana se desnaturalizan y se observa una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green I de la doble hebra de DNA. Los productos de PCR de diferente longitud y distinto porcentaje en G+C tienen temperaturas de hibridación diferentes, y por lo tanto se observa más de una caída significativa en la fluorescencia emitida en función de la temperatura. Cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura ($-dF/dT$) frente a la temperatura, podemos observar un pico si el producto de PCR contenía un único producto de amplificación, o más de uno si durante la PCR se han amplificado regiones inespecíficas además de la secuencia diana (figura M4).

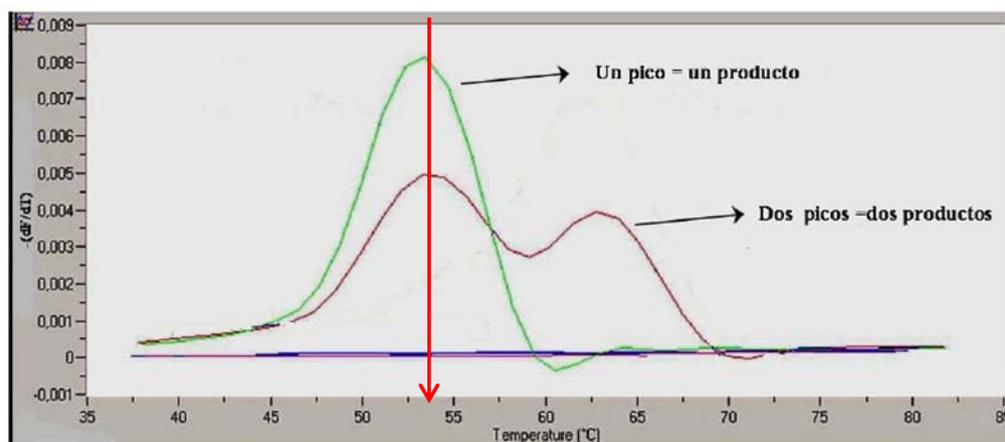


Figura M4. Curva de disociación de dos productos de PCR diferentes para la misma diana. La curva marcada en verde muestra que la fluorescencia emitida por SYBR-green I durante la reacción corresponde a un solo fragmento de DNA amplificado con T_m 53°C (la secuencia diana); mientras la marcada en rojo muestra como la fluorescencia del colorante corresponde con dos secuencias amplificadas diferentes, una de ellas específica (T_m 53°C) y otra inespecífica.

El otro método empleado para detectar el producto específico amplificado por fluorescencia es: *Taqman Gene Expression Assay® Mix 20X* o como lo denominamos más comúnmente: **Sondas Taqman** o **sondas de hidrólisis**. Estas sondas de hibridación específicas son habitualmente nuestra primera elección ya que permiten la detección exclusivamente de la diana que se desea amplificar. Estas sondas son oligonucleótidos de 20-24 bases de longitud, que se unen complementariamente a una secuencia interna dentro del fragmento de DNA amplificado. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo donador (*reporter*) como *Fam* o *Vic* (λ máxima de absorción a 495nm y emisión a 535nm), y en el extremo 3' con un aceptor o sustancia absorbente (*quencher*), que absorbe la fluorescencia liberada por *Fam* o *Vic*, normalmente *Tamra* (λ máxima de absorción a 560nm y emisión a 580nm). De esta forma, el espectro de emisión del primero solapa con el espectro de absorción del segundo. En la tabla M4 se presenta una relación de las Sondas Taqman empleadas en este trabajo. La secuencia de los cebadores que acompañan a la sonda no es facilitada por *Applied Biosystems*.

Gen diana	Secuencia de la sonda 5'→3'	Referencia Comercial	Referencia de acceso al gen
APP murino	TCATGGCGTGGTGGAGGTGCACGCC	Mm01344172_m1	NM_007471.2
PS1 murino	GGACGGTCAGCTAATCTACACCCCA	Mm00501184_m1	NM_008943.1
BACE-1	CCCCACAGACGCTCAACATCCTGGT	Mm00478664_m1	NM_011792.3
BAG-1	GGCATCCAGCAGGGTTTTCTGGCTA	Mm00437768_m1	NM_009736.2
BAG-3	TGACAGGCCTCAGCCCATGACCCAT	Mm00443474_m1	NM_013863.4
Beclina-1	GATTTTGTCTTCCGTACAGGATGGA	Mm01265461_m1	NM_019584.3
V0a1 (H ⁺ -ATPasa)	GAAGAGGCACGGAACACAGTGGGTC	Mm00444210_m1	NM_016920.2
GAPDH	GAACGGATTTGGCCGTATTGGGCGC	Mm99999915_g1	NM_008084.2

Tabla M4. Relación de las Sondas Taqman empleadas en el desarrollo de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mientras la sonda está intacta, no se detecta fluorescencia emitida por el fluorocromos *Fam* o *Vic* ya que la energía se transfiere vía FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*) del fluoróforo de baja longitud de onda en un extremo (*reporter*) al fluoróforo de alta longitud en el otro extremo (*quencher*), apantallando la fluorescencia de baja longitud de onda. Durante la fase de elongación, la sonda que ha hibridado con su secuencia complementaria, va a estar unida a una cadena simple de DNA al igual que los cebadores. Cuando la Taq-polimerasa alcanza la sonda, su actividad exonucleasa 5'-3' libera al fluoróforo donador del oligonucleótido, por lo que la longitud de onda emitida por éste deja de estar apantallada al estar físicamente separado del *quencher* (ver figura M5). Esta fluorescencia es detectada por el lector acoplado en el termociclador. La intensidad de fluorescencia detectada es entonces proporcional a la cantidad de copias generadas del *amplicon* durante la reacción.

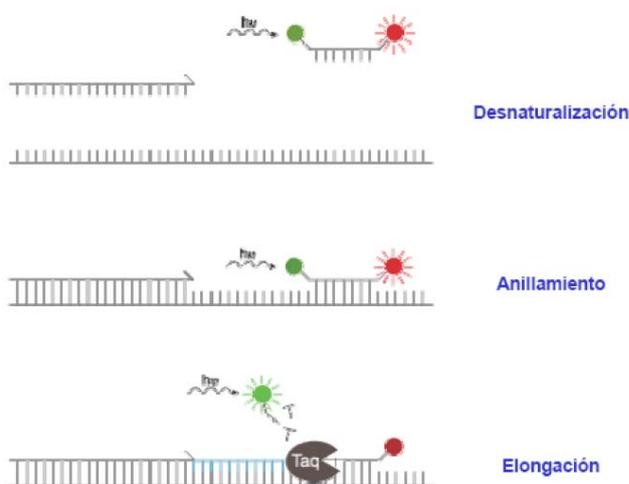


Figura M5. Esquema representativo del funcionamiento de las sondas Tagman. Cuando la sonda está intacta, la energía se transfiere vía FRET del fluoróforo de baja longitud de onda en un extremo (círculo verde) al fluoróforo de alta longitud en el otro extremo (círculo rojo), apantallando la fluorescencia emitida por el primero. Después de la hibridación, la sonda es degradada debido a la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa, y la transferencia de energía vía FRET se interrumpe, por lo que se detecta entonces la fluorescencia de menor longitud de onda y disminuye la de mayor longitud de onda.

5.3 Fundamento de la cuantificación por PCR a tiempo real

Desde que fue creada en 1996 esta metodología se ha utilizado con diferentes objetivos, pero principalmente para la cuantificación de ácidos nucleicos y genotipado. La información obtenida en forma de curvas de amplificación se puede utilizar para determinar la cantidad inicial de muestra con gran precisión, en un amplio rango de concentraciones (muestras con diferencias de más de ocho órdenes de magnitud), y en un gran número de muestras de forma simultánea en muy poco tiempo.

De forma general, el proceso de amplificación exponencial de una determinada diana o fragmento de DNA por PCR se define por la ecuación:

$$X_n = X_0 (E_x)^n$$

Donde “n” es el número de ciclos de la PCR y X_n es la cantidad de la diana amplificada tras “n” ciclos de PCR; X_0 es la cantidad inicial de la diana a amplificar; y E_x es la eficiencia de amplificación para la diana X estudiada. La eficiencia de amplificación de una PCR toma valores comprendidos entre 1, que supondría no amplificación, y 2, que indicaría una amplificación máxima, es decir, todo producto de PCR es replicado en cada ciclo.

La eficiencia de la PCR, como en otras reacciones bioquímicas, no se mantiene constante a lo largo de todo el proceso, siendo máxima al principio de la misma, cuando la amplificación se produce de forma exponencial ($E=2$), mientras que, con el paso de los ciclos la eficiencia empieza a disminuir dando lugar a una fase de amplificación lineal, hasta que finalmente pasa a ser una reacción de orden 0, apareciendo una fase de saturación. Este fenómeno se debe a que inicialmente la concentración de cebadores es muy alta respecto a la diana que se desea amplificar, sin embargo, a lo largo de la PCR este ratio va disminuyendo progresivamente, por lo que durante el transcurso de la reacción disminuye la probabilidad de que los cebadores se apareen con la secuencia diana y aumenta la de que las dos hebras complementarias del producto de PCR vuelvan a aparearse entre sí durante la fase de hibridación. Por lo tanto, solo al principio de la reacción (fase exponencial de amplificación) se duplica todo el material genético correspondiente a la diana después de cada ciclo; mientras que en etapas más tardías la eficiencia de la reacción disminuye hasta que finalmente se alcanza la saturación.

Para poder cuantificar las cantidades iniciales presentes de una diana determinada mediante PCR a tiempo real, nos basamos en el concepto de **Cycle threshold**, ciclo *threshold* o **Ct**, que se define como el ciclo de PCR en el que la curva de amplificación de la diana en cuestión se distingue del ruido de fondo o fluorescencia *background*. El valor de ciclo *threshold* obtenido es directamente dependiente de la cantidad inicial de la diana a amplificar en la muestra, y coincide con la fase exponencial de amplificación. El valor umbral o *threshold* se determina automáticamente por el software utilizado para el análisis (SDS v1.7 o v3.2) en función de la fluorescencia *background* existente una vez ha finalizado el experimento y es el mismo para todas las muestras, de modo que a nivel cuantitativo lo único que diferencia las distintas muestras analizadas es el ciclo en el que alcanzan este umbral (Ct).

Por lo tanto, cuando $n = Ct$, la ecuación pasaría a describirse como:

$$X_{Ct} = X_0 (E_{x,Ct})^{Ct}$$

Donde Ct es el ciclo de amplificación donde se alcanza el umbral *threshold* y X_{Ct} es la cantidad de diana amplificada en el ciclo *threshold*; X_0 es la cantidad inicial de diana a amplificar; y $E_{x,Ct}$ es la eficiencia de amplificación para la diana en el ciclo *threshold*.

Despejando el valor Ct llegamos a esta expresión, que es la ecuación de una recta:

MATERIALES Y MÉTODOS

$$Ct = (-1/\log E_{x,Ct}) \log X_0 + \log X_{Ct} / \log E_{x,Ct}$$

Donde al representar Ct frente al logaritmo de la cantidad inicial de la diana estudiada, la pendiente m sería: $-1/\log E_{x,Ct}$ y la ordenada en el origen: $\log X_{Ct} / \log E_{x,Ct}$.

Por lo tanto la eficiencia del proceso de PCR para la diana amplificada X, en el ciclo *threshold*, vendría dada por la expresión:

$$E_{x,Ct} = 10^{-1/m}$$

Por lo tanto, para obtener un valor de eficiencia máxima $E_{x,Ct} = 2$, la pendiente de la representación **Ct vs logX₀** debe tener el valor: -3.2; de donde se deduce que la amplificación de la diana presenta su máxima eficiencia en el ciclo *threshold*. Sin embargo, la eficiencia del proceso de PCR en este punto es también dependiente de los cebadores diseñados para la diana en cuestión, por lo que se hace necesario un test de este tipo (representación de Ct vs logX₀) para evaluar la eficiencia del proceso en el ciclo *threshold*, para cada par de cebadores nuevos empleados, antes de abarcar ensayos de cuantificación en las muestras problema. Por el contrario, cuando empleamos sondas *Taqman* no es necesario llevar a cabo este procedimiento puesto que *Applied Biosystems* ofrece garantías de que las sondas empleadas se dan lugar a un proceso de amplificación de la máxima eficiencia.

En la figura M6, se presenta un ejemplo de cómo varía el Ct en función de la cantidad inicial de muestra, para la amplificación de GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y Somatostatina (marcador representativo una subpoblación de interneuronas GABAérgicas), empleando cebadores específicos para cada uno de ellos junto a SYBR-green I. Como era de esperar, la representación de Ct vs logX₀ para ambos marcadores muestra pendientes que corresponden con una eficiencia ~2. En este sentido, todos los cebadores empleados en el transcurso de este trabajo han mostrado una eficiencia de 1.8 a 2, mientras aquellos para los que no se han obtenido estos valores han sido desechados, y diseñados otros nuevos en su lugar o adquiridas sondas *Taqman* para la cuantificación.

Para la cuantificación de los niveles de expresión iniciales de una diana dada hemos utilizado el método de comparación de Ct (Ramos et al., 2006), usando GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada) como *housekeeper* o referencia. Éste gen se expresa constitutivamente en niveles moderadamente abundantes en la mayoría de los tipos celulares, y su expresión normalmente es constante en todas las muestras. Durante el desarrollo de los experimentos de PCR a tiempo real para cuantificación, la reacción del *housekeeper* se hace en paralelo con la diana estudiada, y los valores de ciclo *threshold* (Ct) se calculan con el *software* proporcionado por Applied Biosystems (SDS v1.7 o v3.2) tanto para la diana estudiada como para el *housekeeper*.

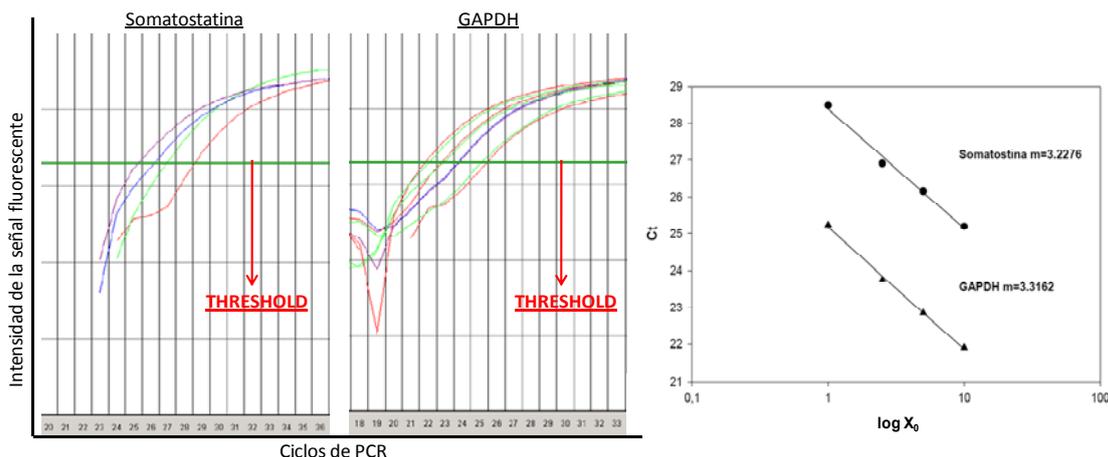


Figura M6. Curvas de amplificación para los genes somatostatina y GAPDH. Cantidades de partida de 1; 2.5; 5 y 10 ul de una dilución 1/100 de la retrotranscripción obtenida para un animal control se han empelado en la amplificación de ambos genes. Para la detección empleamos cebadores específicos junto con SYBR-green I. En la representación se observa la relación obtenida para el Ct obtenido en función de la cantidad de partida de cDNA. En ambos casos, las pendientes obtenidas reflejan una eficiencia de amplificación máxima.

Por lo tanto, la cantidad amplificada de la diana estudiada (X) y el housekeeper (R) en el ciclo *threshold* vendrá dada por las expresiones:

$$X_{Ct} = X_0 (E_{X,Ct})^{Ct(X)}$$

$$R_{Ct} = R_0 (E_{R,Ct})^{Ct(R)}$$

Donde R_{Ct} es la cantidad de moléculas amplificadas del *housekeeper* en el ciclo *threshold*; R_0 es el número de copias inicial del *housekeeper*; $E_{R,Ct}$ es la eficiencia de amplificación para el gen *housekeeper* en el ciclo *threshold*; y, $Ct(X)$ y $Ct(R)$ son los valores de ciclo *threshold* (Ct) para la diana amplificada y para la referencia respectivamente.

Para obtener una relación de la expresión del gen estudiado con respecto al housekeeper, procedemos a relacionar los parametros X_{Ct} y R_{Ct} :

$$\frac{X_0}{R_0} (E_{Ct})^{Ct(X)-Ct(R)} = K$$

Para una misma muestra la relación X_{Ct}/R_{Ct} siempre será constante (K), y asumiendo que la eficiencia de amplificación en el ciclo *threshold* E_{Ct} para la diana estudiada y para el housekeeper son las mismas, la expresión quedaría así:

$$\frac{X_0}{R_0} (E_{Ct})^{Ct(X)-Ct(R)} = K$$

O bien:

$$\frac{X_0}{R_0} = K (E_{Ct})^{-\Delta Ct}$$

MATERIALES Y MÉTODOS

Si asumimos que la eficiencia del proceso es máxima en el ciclo *threshold*, podemos concluir:

$$\frac{X_0}{R_0} = K (2)^{-\Delta Ct}$$

Donde X_0/R_0 es la cantidad inicial normalizada de la diana estudiada, o unidades relativas de expresión respecto al *housekeeper*, y ΔCt es la diferencia de ciclos de PCR entre los ciclos *threshold* de la diana y la referencia: $Ct(X)-Ct(R)$ en una muestra determinada.

Finalmente, se normaliza la relación X_0/R_0 en una muestra dada respecto a una referencia interna. En nuestro caso, respecto a la misma relación X_0/R_0 promedio de un grupo de muestras control (normalmente un grupo de animales *wild-type* de 6 meses).

$$\frac{X_0/R_0}{X_0/R_0 (RI)} = \frac{K (2)^{-\Delta Ct}}{K (2)^{-\Delta Ct (RI)}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde RI se refiere a los mismos parámetros para la referencia interna en lugar de para la muestra en cuestión; y $\Delta\Delta Ct$ corresponde a la diferencia: ΔCt (muestra en cuestión) – ΔCt (referencia interna).

Por lo tanto, las unidades de expresión de la diana estudiada normalizada por el *housekeeper* y relativa a una referencia interna, viene dada por la expresión:

$$\text{Unidades de expresión relativas} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

(Livak and Schmittgen, 2001)

5.4 Procedimiento

El procedimiento a seguir para preparar la reacción de PCR a tiempo real es ligeramente diferente en función de que usemos SYBR-green I o Sondas Taqman para detectar la amplificación de la diana estudiada.

En el caso de que empleemos SYBR-green I, junto con un par de cebadores específicos diseñados para una diana en concreto, debemos hacer en primer lugar un ensayo preliminar partiendo de diferentes cantidades de partida de cDNA, con la finalidad de calcular la eficiencia del proceso de amplificación en el ciclo *threshold* al emplear los nuevos cebadores (representación de Ct frente $\log X_0$). Igualmente, debemos llevar a cabo un protocolo de disociación del producto de PCR obtenido con la finalidad de conocer la especificidad de nuestros cebadores durante la reacción (ver fundamentos de la amplificación y cuantificación por PCR a tiempo real).

Una vez comprobada la especificidad de los cebadores y la eficiencia de reacción en el ciclo *threshold*, podemos pasar a cuantificar la expresión de la diana deseada con respecto al housekeeper (GAPDH) tanto en las muestras problemas como controles, empleando la ecuación de Livak y Schmittegen ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), para calcular la expresión relativa de la diana en cuestión.

Para preparar las reacciones de PCR empleando SYBR-green I que hemos desarrollado en este trabajo, seguimos los volúmenes especificados en la tabla M5.

Componentes de la reacción	Volumen (µl)
<i>FastStart SYBR-Green® Master Mix 2X</i>	10
Cebadores (Sentido/Antisentido)	0.6
cDNA producto de retrotranscripción (diluido 1/100)	5
Volumen final (1 reacción)	20

Tabla M5. Relación de los reactivos empelados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando SYBR-green I. El cDNA empelado para la reacción puede estar diluido 1/100, y en este caso empleamos 5µl; o bien no diluido, entonces empleamos 1µl. El volumen empleado de cDNA está en función de la expresión inicial de la diana que se desea amplificar.

En caso de que optemos por el uso de Sondas Taqman para la amplificación de la diana estudiada, no es necesario llevar a cabo las comprobaciones antes mencionadas antes de la cuantificación, pues las sondas de hidrólisis suministradas por *Applied Biosystems* han pasado previamente controles pertinentes que nos garantizan tanto la especificidad de la sonda por la diana como la eficiencia de amplificación para la diana en el ciclo *threshold*. Por lo tanto, el uso de estas sondas tiene esta ventaja, aunque el inconveniente de ser mucho más costoso económicamente.

Para preparar las reacciones de PCR empleando Sondas Taqman como señal fluorescente seguimos los volúmenes especificados en la tabla M6.

Componentes de la reacción	Volumen (µl)
<i>Taqman® Universal PCR Master Mix 2X</i>	10
<i>Taqman Gene Expression Assay® Mix 20X</i>	1
cDNA producto de retrotranscripción (diluido 1/100)	5
Volumen final (1 reacción)	20

Tabla M6. Relación de los reactivos empelados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando Taqman. El cDNA empelado para la reacción puede estar diluido 1/100, y en este caso empleamos 5µl; o bien no diluido, entonces empleamos 1µl. El volumen empleado de cDNA está en función de la expresión inicial de la diana que se desea amplificar.

Una vez preparadas las reacciones según la mezcla de volúmenes detallada en placas de 96 pocillos compatibles con alguno de los termocicladores empleados para PCR a tiempo real (ABI 7000 o ABI 7900HT), pasamos a realizar la amplificación, siguiendo el programa detallado en la tabla M7.

MATERIALES Y MÉTODOS

Etapas preliminares		40 ciclos	
Activación de Taq-polimerasa	Desnaturalización cDNA	Desnaturalización cDNA	Hibridación / Elongación
50°C 2 minutos	95°C 10 minutos	95°C 15 segundos	60°C 1 minuto

Tabla M7. Programa predeterminado de amplificación para PCR a tiempo real. Estas condiciones han sido previamente establecidas por *Applied Biosystems* para el uso de Sondas Taqman o cebadores diseñados con el software Primer Express v2.0.

6. Obtención de proteínas solubles y preparación de membranas.

Los extractos de proteínas totales obtenidos a partir de centros cerebrales utilizando el reactivo *Tripure® Isolation Reagent* (Roche) están constituidos por proteínas totalmente desnaturalizadas y finalmente solubilizadas en SDS 4%-UREA 8M. La utilidad de estas proteínas es principalmente la cuantificación de diferentes marcadores mediante Western-blot (ver más adelante). Sin embargo, otras aproximaciones bioquímicas empleadas durante el desarrollo de esta tesis no permiten partir de estos extractos, sino que requieren tejido fresco o preparaciones de membranas lipídicas.

6.1 Reactivos

- Tampón isotónico de trabajo: Sacarosa (Sigma) 0.32M, EDTA (Sigma) 1mM, EGTA (Sigma) 1mM en Tris-HCl 20mM pH 7.4.
- Inhibidores de proteasas (Roche).
- Inhibidores de fosfatasa: Na_3VO_4 (Sigma) 1mM y NaF (Sigma) 50mM.

6.2 Aislamiento de la fracción de proteínas solubles (S1)

Un fraccionamiento simple empleado en nuestro laboratorio, y que nos ha servido para llevar a cabo varias aproximaciones bioquímicas consiste en separar las proteínas solubles de origen extracelular y citosólicas del contenido de membranas lipídicas por ultra-centrifugación diferencial. Esta aproximación nos ha permitido llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de A β oligomérico soluble y de las formas solubles de la proteína APP del medio extracelular.

6.2.1 Procedimiento.

Para la obtención de las fracciones solubles S1 hemos utilizado cortezas de animales PS1xAPP o controles, ya que al partir de hipocampos la concentración final de proteínas obtenida es demasiado baja. En primer lugar, tomamos una hemicorteza del animal de interés y la homogenizamos en Dounce's (Wheaton) en tampón isotónico frío tris-sacarosa pH 7.4 (40-50 mg tejido/ml tampón) más un cocktail completo de inhibidores de proteasas y fosfatasa, utilizando 50 pases del pistilo con menor diámetro (paso de luz: 0.089-0.14mm), y 20 pases del que tiene mayor diámetro (paso de luz: 0.025-0.076mm). Posteriormente, el homogenado de corteza se centrifuga a 1500 xg, durante 10 minutos a 4°C, para precipitar núcleos y tejido no disgregado mecánicamente. El precipitado lo descartamos y el sobrenadante lo centrifugamos

de nuevo a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C (*Optima Max*, Beckman Coulter). El sobrenadante resultante de ésta ultracentrifugación constituye la fracción de proteínas solubles extracelular/citosólicas (S1). A las fracciones S1 aisladas se les determina la concentración de proteínas mediante micro-lowry, para posteriormente alicuotear y congelar a -80°C hasta su uso.

6.3 Preparación de membranas lipídicas

La fracción de membranas obtenida tras homogenizar las cortezas de los animales constituyen una muestra partida óptima a la hora de estudiar proteínas de membrana o la actividad enzimática implicada en la ruta de producción del β -amiloide.

6.3.1 Procedimiento

Tras aislar la fracción S1 según el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1, tomamos el pellet de membranas precipitado a 100.000 xg y lo resuspendemos en el mismo tampón isotónico junto con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas para lavar y centrifugar. El sobrenadante de este lavado se descarta, y el precipitado de membranas se resuspende de nuevo en el mismo tampón. Tras determinar la concentración de proteínas el homogenado se alicuotea y congela a -80°C hasta su uso. Cabe destacar que en el caso de los animales PS1xAPP, estas preparaciones de membranas contienen además placas de β -amiloide extracelulares e insolubles, como se mostrará más adelante en el apartado de resultados.

7. Solubilización secuencial de proteínas de membrana

7.1 Reactivos

- Solución CHAPS (Sigma) al 1% (p/v) en PBS frío.
- Solución CHAPS al 1%(p/v), DOC (Sigma) al 1% (p/v) y SDS (Applichem) al 2% (p/v) en PBS frío.
- Solución SDS al 2% (p/v) en PBS.
- Solución SDS al 4% (p/v) y UREA (Panreac) 8M en PBS.
- Inhibidores de proteasas (Roche).
- Inhibidores de fosfatasas: Na_3VO_4 (Sigma) 1mM y NaF (Sigma) 50mM.

7.2 Fundamento

A partir de las preparaciones de membranas, vamos a analizar la solubilidad de las proteínas de membrana bajo diferentes condiciones. A este tipo de experimentos los denominamos “de solubilización secuencial” porque la misma muestra es solubilizada sucesivamente en una batería de detergentes partiendo de condiciones suaves hasta otras más agresivas. De este modo, podemos conocer la diferente susceptibilidad de las proteínas de membrana a solubilizarse por diferentes detergentes. El principal factor que determina una correcta solubilización es la concentración inicial de lípidos, por lo que optamos por solubilizar a concentraciones bajas de proteína (1 mg/ml) con el fin de conseguir la formación de micelas detergente-lípido y detergente-proteína. En primer lugar utilizamos CHAPS, que es un

MATERIALES Y MÉTODOS

detergente zwitterionico no desnaturizante con baja capacidad para solubilizar proteínas de membranas. Según nuestros resultados, con este detergente solamente conseguimos solubilizar del 30-50% de las proteínas de membranas. A la fracción remanente de proteínas no solubilizadas añadimos una mezcla de CHAPS-DOC-SDS. Las micelas mixtas formadas por estos 3 detergentes poseen propiedades de solubilización intermedias entre el CHAPS y el SDS. Finalmente, utilizamos SDS al 2% para solubilizar la fracción resistente a la mezcla anterior. En el caso de membranas procedentes de animales WT conseguimos de esta manera solubilizar la totalidad de las proteínas, sin embargo, en el caso de los animales transgénicos, la presencia de placas del amiloide hace necesario utilizar una última solubilización con SDS 4%-Urea 8M, combinación que habitualmente utilizamos para solubilizar las placas del amiloide.

7.3 Procedimiento

En primer lugar preparamos una mezcla de membranas de corteza de 3 animales wild-type o PS1xAPP conteniendo 200µg de proteína en PBS junto con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Esta mezcla se centrifuga a 100.000 xg, 1 hora, a 4°C para precipitar las membranas. Tras descartar el sobrenadante, el pellet de membranas se solubiliza en 200 µl de CHAPS 2% durante 30 minutos a 4°C. Pasado los primeros 5 minutos, la muestra se sonica dos veces 30 segundos a 50W. Posteriormente, centrifugamos a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C, para precipitar el pellet resistente a la solubilización por este detergente. El sobrenadante se congela a -80°C para posterior análisis y el precipitado se solubiliza en 200 µl de una mezcla más agresiva (CHAPS1%-DOC1%-SDS2%) a 4°C durante 30 minutos, es sonicado bajo las condiciones anteriormente descritas, y después se centrifuga a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C. Almacenamos el sobrenadante y repetiremos el mismo procedimiento con el pellet utilizando 200 µl de SDS 2% a temperatura ambiente, para evitar que precipite el SDS. De esta solubilización obtenemos un último precipitado tras centrifugar a 100.000 xg, que solubilizaremos con 200 µl de SDS 4%-Urea 8M durante 1 hora a temperatura ambiente.

8. Discriminación de proteínas presentes en dominos de membrana resistentes a la solubilización por detergentes (Rafts lipídicos).

Además de las proteína extraídas por “solubilización secuencial”, hemos aislado las proteínas contenidas en regiones de membrana tipo DRM/“Raft” (dominios de membrana resistentes a la solubilización por detergentes) ricos en lípidos, especialmente colesterol y esfingolípidos (Simons and Toomre, 2000 para revisión).

8.1 Reactivos

- Solución de sacarosa (Sigma) al 90% (p/v) en PBS.
- Solución de sacarosa al 35% (p/v) en PBS.
- Solución de sacarosa al 5% (p/v) en PBS.
- Solución de CHAPS (Sigma) al 2% (p/v) en PBS.

- Inhibidores de proteasas (Roche).

8.2 Fundamento

Después de un tratamiento con un detergente suave, las proteínas de los dominios **DRM/Raft** probablemente forman micelas mixtas detergente-lípido-proteína capaces de flotar en un gradiente de densidad en medio acuoso y diferenciarse de las proteínas aisladas en micelas puras de detergente. Para este tipo de experimentos se parte de una concentración baja de proteínas de membrana (1 mg/ml), y se usan detergentes con baja capacidad para solubilizar y bajo poder desnaturizante (normalmente detergentes no iónicos o zwitterionicos).

8.3 Procedimiento

Partimos de una preparación de membranas de corteza con 200 µg de proteína, que se somete a sonicación (2 pulsos de 30 segundos a 50W), seguido de centrifugación a 100.000 xg, durante 1 hora a 4°C, en un rotor basculante TLS-55 (Beckman Coulter).

Las membranas precipitadas se solubilizan durante 30 minutos en 200 µl de CHAPS al 2% en PBS a 4°C en presencia de inhibidores de proteasa, y posteriormente añadimos 200µl de sacarosa al 90%. Tras mezclar bien ambas fases obtenemos 0.4ml de una fase de sacarosa al 45% que contiene las proteínas solubilizadas. Sobre esta fase depositamos con una pipeta Pasteur de vidrio 1.2ml de sacarosa al 45%. Finalmente situamos sobre la fase al 35% 0.4ml de sacarosa al 5%, obteniendo así un volumen de 2ml de un gradiente discontinuo de sacarosa.

A continuación, centrifugamos el gradiente a 100.000 xg durante 18 horas a 4°C en el rotor basculante TLS-55 (*Optima max; Beckman Coulter*) (Abad-Rodriguez et al., 2004); (Hur JY et al., 2008) evitando los cambios bruscos en la aceleración/desaceleración. Pasado este tiempo, en el gradiente se puede observar una interfase entre las fases del 5%-35% y 35%-45%. Tomamos 10 alícuotas de 200 µl desde la superficie del gradiente hasta el fondo del tubo. Finalmente el pellet del gradiente se solubiliza en 200µl de SDS al 2% o de SDS 4%-Urea 8M durante 30 minutos. Todas las fracciones del gradiente se guardan a -80°C hasta que las usemos para analizarlas por western-blot.

8.4 Elección del detergente adecuado para discriminar proteínas de membrana presentes en dominios DRM/Raft lipídico

Para solubilizar las proteínas de membranas hemos utilizado numerosos detergentes y condiciones.. El detergente de elección para diferenciar las proteínas solubilizadas en gradiente de densidad ha sido CHAPS al 2% (Schuck et al., 2003). Previamente hemos estudiado la capacidad de flotación en el gradiente de sacarosa de dos marcadores de Raft lipídicos (flotilina-1 y caveolina-2) tras de solubilizar la muestra de membranas en distintos detergentes: CHAPS1%; CHAPS 2%; CHAPS1%-DOC1%; CHAPS1%-SDSx%; CHAPS1%-DOC1%-SDS2%; Octilglucosido 2%; y Tritón X-100 1% (ver figuras M7 y M8).

MATERIALES Y MÉTODOS

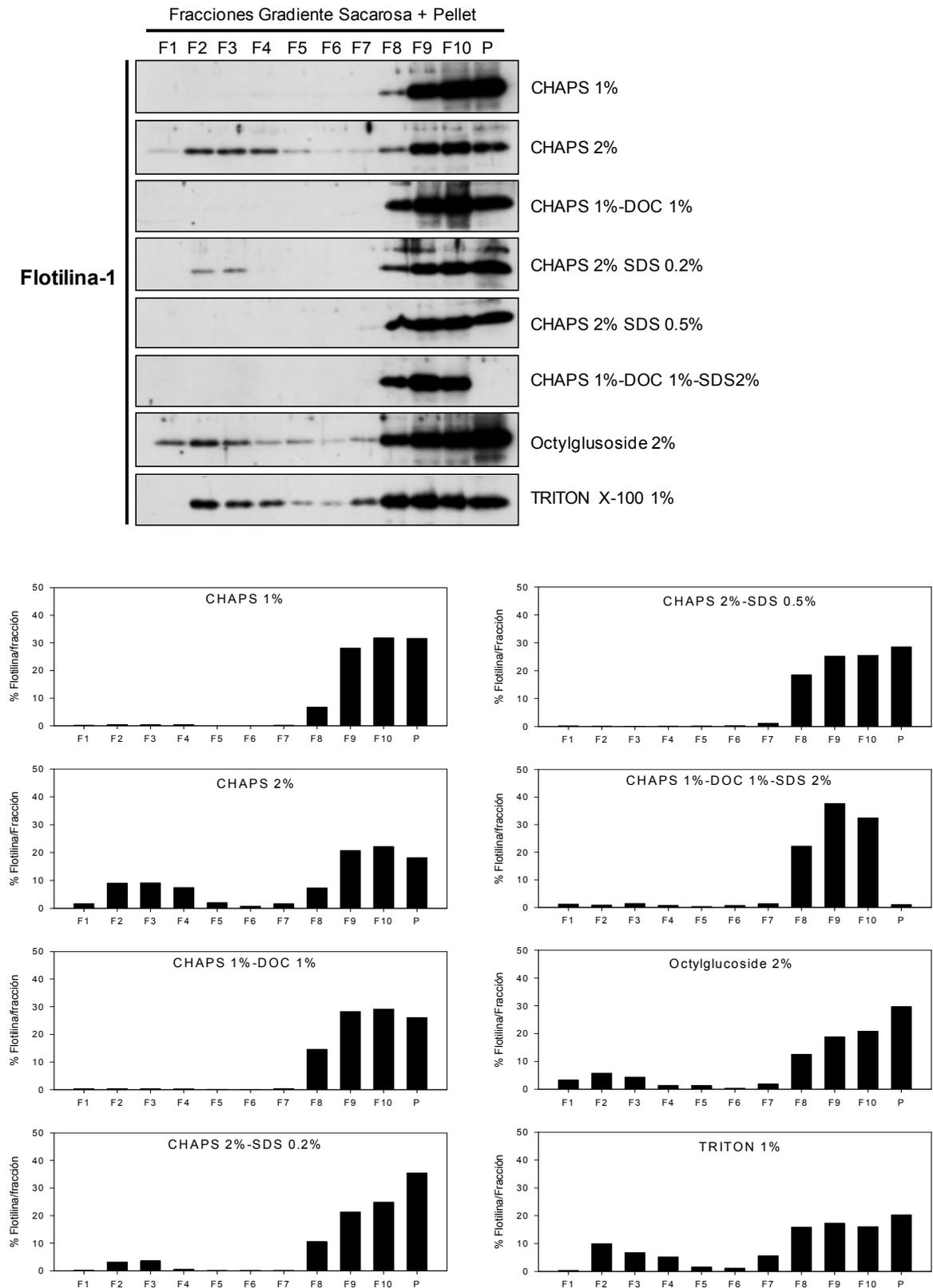


Figura M7. Análisis de flotilina-1 en gradientes de sacarosa tras solubilización empleando diversos detergentes.

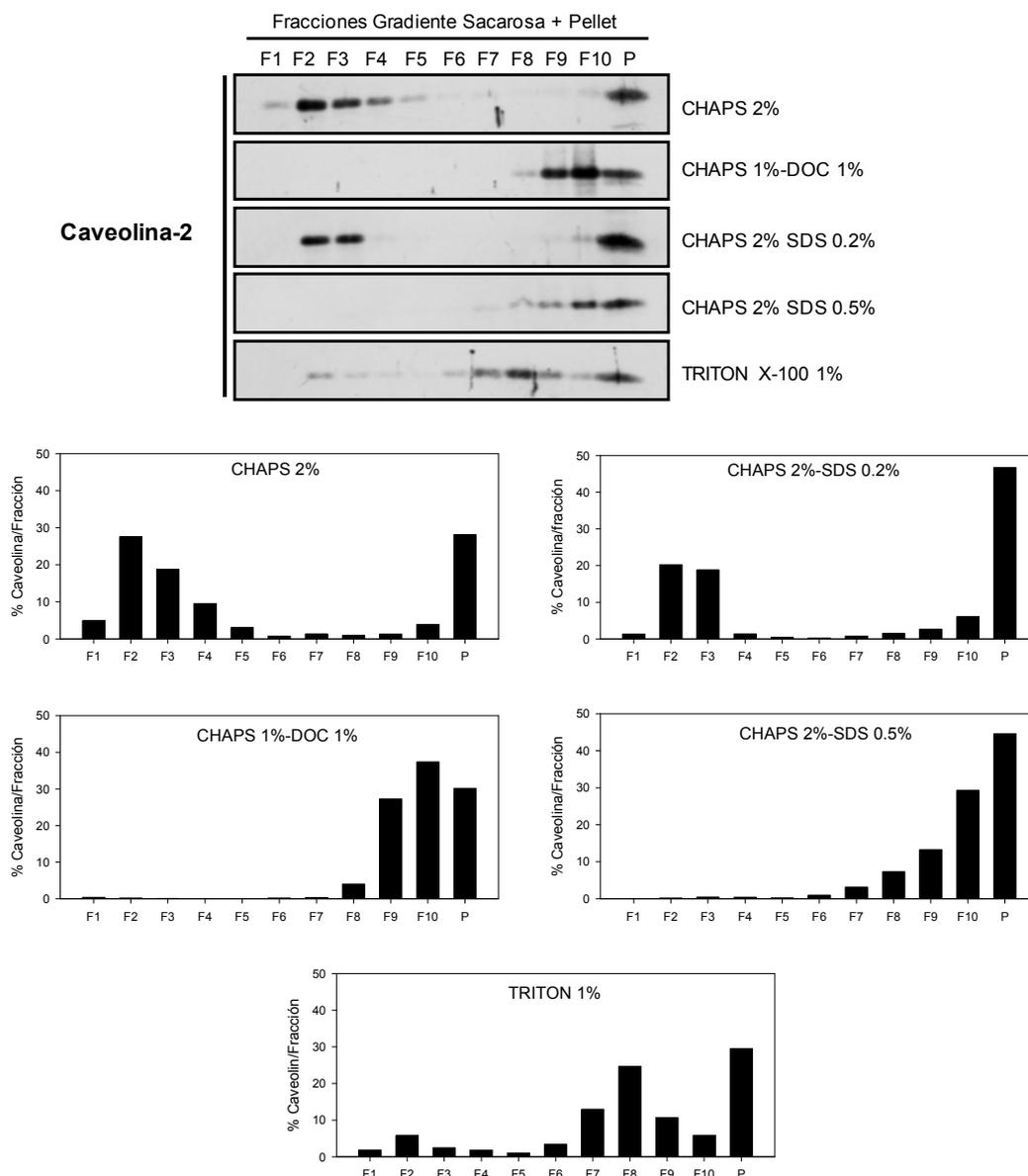


Figura M8. Análisis de caveolina-2 en gradientes de sacarosa tras solubilización empleando diversos detergentes.

De acuerdo con los resultados mostrados en las figuras M7 y M8, hemos optado por emplear CHAPS al 2% para para discriminar las proteínas de membrana presentes en dominios DRM en animales wild-type y PS1xAPP de distintas edades.

9. Obtención/fraccionamiento de muestras en gradientes de densidad.

9.1 Aislamiento de sinaptosomas de ratón en gradientes de ficoll PM400

Las muestras de sinaptosomas, aun aisladas con distintos métodos, se utilizan ampliamente para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la enfermedad de Alzheimer (Castegna et al., 2004; Fein et al., 2008; Gong et al., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

9.1.1 Reactivos

- Tampón de trabajo isotónico: 0.32M sacarosa (Applichem), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma) en 20mM Tris-HCl pH 7.5.
- Solución ficoll PM400 (Amersham) al 16% (p/v) en solución de trabajo.
- Solución ficoll PM400 (Amersham) al 7% (p/v) en solución de trabajo.
- Inhibidores de proteasas (Roche).
- Inhibidores de fosfatasas: Na_3VO_4 (Sigma) 1mM y NaF (Sigma) 50mM.

9.1.2 Fundamento

El método seguido para aislar sinaptosomas de nuestros animales WT y transgénicos es prácticamente igual al descrito por (Booth RF and Clark JB, 1978), con algunas modificaciones. Según este método, los sinaptosomas formados durante el proceso de homogenización se precipitan a 12000 xg a 4°C, y se aíslan por flotación en un gradiente discontinuo de ficoll PM400, que consta de 3 fases: 13%, 7% y 0% (p/v). Brevemente, tras la centrifugación a 12000 xg de un sobrenadante post-nuclear se obtiene un pellet denominado fracción mitocondrial cruda, donde se encuentra el contenido total de mitocondrias, tanto las libres como las englobadas en sinaptosomas. Este pellet se resuspende en una fase de ficoll al 13%,. Tras la centrifugación de este gradiente a 100 000 xg las mitocondrias libres quedan en el pellet del gradiente mientras los sinaptosomas se diferencian en la interfase entre el 13% y el 7% (p/v). Por otro lado, el contenido de orgánulos celulares no precipitados a 12000 xg (sin mitocondrias) es denominado fracción microsomal, y también se recupera por centrifugación a 100 000 xg.

Aunque el protocolo descrito en este trabajo se basa en la flotabilidad de los sinaptosomas en gradiente de ficoll, otros autores también han optado por alternativas como el uso de gradientes de sacarosa o percoll con resultados satisfactorios.

9.1.3 Procedimiento

En primer lugar, descongelamos y pesamos una hemicorteza de ratón (80-100mg), previamente diseccionada. Este tejido se homogeniza en 2ml de solución de trabajo isotónica a 4°C, junto con inhibidores de proteasas y fosfatasas, utilizando 50 pases del pistilo con menor diámetro (paso de luz: 0.089-0.14mm), y 20 pases del que tiene mayor diámetro (paso de luz: 0.025-0.076mm). El homogenado se centrifuga a 1500 xg a 4°C durante 10 minutos. A continuación, sometemos el sobrenadante post-nuclear a una nueva centrifugación a 12600 xg a 4°C durante 20 minutos tras la que obtenemos un pellet (extracto crudo mitocondrial, que contiene mitocondrias libres y sinaptosomas), y un sobrenadante en el que están las membranas microsomales, y las proteínas solubles del citosol/medio extracelular. A partir del pellet obtendremos la fracción sinaptosomal, y del sobrenadante la fracción microsomal y la soluble (S1).

El pellet producto de la centrifugación a 12600 xg, lo resuspendemos en 0.65ml de ficoll al 16% (p/v) en tampón de trabajo isotónico a 4°C, y lo llevamos hasta un volumen final de 0.8ml para conseguir una fase de ficoll al 13% (p/v).. Sobre esta fase depositamos otra de 0.8ml de ficoll al 7% (p/v), y una más de 0.4 ml de la solución isotónica de trabajo sin ficoll, con lo que finalmente obtenemos nuestro gradiente discontinuo de ficoll. Este gradiente se centrifuga durante 45 minutos a 100.000 xg y a 4°C. Haciendo uso de una pipeta Pasteur aspiramos la interfase del 13 al 7% ficoll (fracción sinaptosomal),y la diluimos con 12ml más de la solución de trabajo isotónica a 4°C, para conseguir que los sinaptosomas precipiten por centrifugación. Tras centrifugar a 12600 xg durante 20 minutos, a 4°C, el pellet de sinaptosomas se lava y se resuspende en 150 µl de la solución de trabajo isotónica con inhibidores de proteasas/fosfatasas (2x).

El sobrenadante procedente de la centrifugación a 12600 xg, se centrifuga a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C en un rotor TLA-110 (*Beckman-Coulter*) obteniendose un nuevo sobrenadante (fracción de proteínas solubles a la que hemos denominado rutinariamente S1) y un pellet, correspondiente a la fracción microsomal. Dicho pellet se lava en solución de trabajo isotónica, y se resuspende en 150 µl del mismo tampón de trabajo con inhibidores de proteasas/fosfatasas (2x). Tras determinar la cantidad de proteína mediante micro-lowry, todas las fracciones obtenidas siguiendo este protocolo se alicuotean y congelan a -80°C hasta su uso.

Como control interno indicativo de la eficiencia del aislamiento de sinaptosomas hemos empleado la inmuno-reactividad detectada por western-blot de la enzima ATP-sintetasa-β mitocondrial. Por un lado, las mitocondrias libres no pueden flotar en ficoll al 13% (p/v), por lo que la detección de este marcador en la interfase del 13% al 7% (p/v) ficoll es indicativa de la presencia e integridad de los sinaptosomas aislados siguiendo este método. Por otro lado, bajo las condiciones descritas para precipitar los sinaptosomas (20 minutos, 12600 xg), no hemos encontrado la enzima ATP-sintetasa-β mitocondrial en la fracción microsomal (figura M9), lo que indica que prácticamente la totalidad de las mitocondrias libres y sinaptosomas, que se encontraban inicialmente en el homogenado del tejido, han sido precipitadas bajo las condiciones descritas.

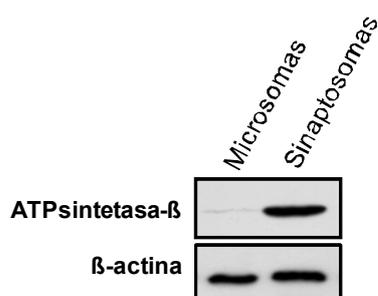


Figura M9. Presencia de la enzima ATP-sintetasa-β en la fracción micro- y sinaptosomal. Cantidades iguales de proteínas se han empleado para testar la presencia de de esta enzima por western-blot en estas fracciones.

9.1.4 Cálculo del rango de densidad en el que se diferencian los sinaptosomas en gradiente discontinuo de ficoll PM400.

Con objeto de conocer la densidad en la cual podemos diferenciar los sinaptosomas en un gradiente de ficoll, hemos preparado una serie de diluciones seriadas de ficoll al 16%, 13%, 10%, 7%, 4% y 0% (p/v) en solución isotónica de trabajo, a las que hemos determinado la densidad ρ (g/ml). A partir de los resultados obtenidos, hemos construido una curva patrón (figura M10), según la cual la interfase de ficoll del 13% al 7%, donde se aíslan los sinaptosomas, comprendería un rango de densidad de 1.077 a 1.095 g/ml.

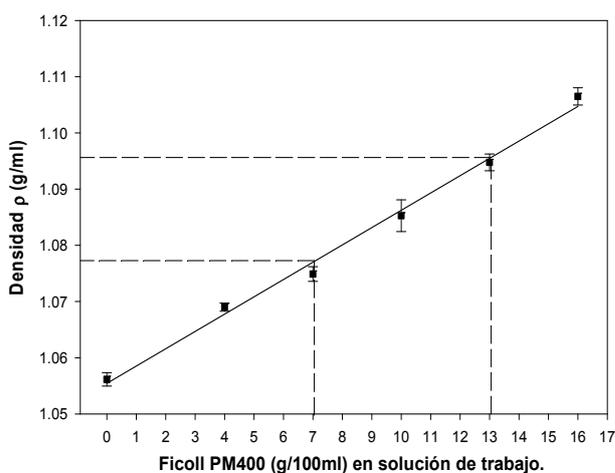


Figura M10. Densidad versus concentración de ficoll PM400. Relación lineal entre el valor de densidad ρ (g/ml) y la concentración de ficoll PM400 (g/100ml) en solución isotónica de trabajo.

9.2 Fraccionamiento del contenido microsomal en gradientes de iodixanol (Optiprep®).

9.2.1 Reactivos

- Optiprep® (Sigma): Iodixanol 60% (p/v) en agua.
- Optiprep solución de trabajo isotónica: 50% (p/v) Iodixanol, 0.25M sacarosa (Sigma), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma), 10mM Tris-HCl pH 7.5.
- Solución de trabajo isotónica: 0.25M sacarosa (Sigma), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma), 10mM Tris-HCl pH 7.5.
- Inhibidores de proteasas (Roche).

9.2.2 Fundamento

Los orgánulos celulares son compartimentos membranosos susceptibles de diferenciarse en gradientes de densidad. Tanto el contenido de membranas procedente de un lisado de células en cultivo (Iwata et al., 2001; Kim et al., 2002; Woods et al., 2002; Hood et al., 2004; Hirose et al., 2004), como el procedente de homogenados de tejidos (Koulen et al., 2002; Lee et al., 2003; Salvi et al., 2004; Gandy et al., 2007) puede ser fraccionado en gradientes continuos de iodixanol. Sin embargo, cuando se usan homogenados de regiones cerebrales, los sinaptosomas formados durante el proceso de homogenización pueden interferir en la

diferenciación de orgánulos en un gradiente de densidad. Por este motivo, hemos optado por someter a esta técnica el contenido de membranas correspondiente a la fracción microsomal, libre de mitocondrias, sinaptosomas y proteínas solubles. La densidad de los compartimentos membranosos de origen celular cambia de este modo: membrana plasmática < endosomas tempranos < trans-Golgi < cis-golgi < retículo endoplásmico < endosomas tardíos < lisosomas (Li et al., 2002), aunque existen excepciones a este esquema general. En la tabla M8 se detallan los marcadores empleados en este trabajo para la identificación de los orgánulos celulares y en la tabla M13 las características más relevantes de los anticuerpos utilizados en la detección de estos marcadores.

Aunque hemos empleado distintas aproximaciones para el fraccionamiento de los orgánulos celulares en base a su densidad, finalmente hemos optado por utilizar tiempos largos de centrifugación a velocidad baja (18 horas, a 50 000 xg), desechando otras condiciones con tiempos más cortos (1-3 horas) a velocidad de centrifugación más alta (100 000 - 200 000 xg) (Kim et al., 2002). De este modo conseguimos un verdadero equilibrio en la separación diferencial de los compartimentos celulares en función de su densidad.

Orgánulo celular	Marcador relacionado
Retículo endoplásmico	Grp78
Trans-Golgi	Sintaxina 6
Endosomas tardíos	Sintaxina 13
Cuerpos multi-vesiculares (MVB)	Rab7
Mitocondrias	ATP-sintetasa-β
Vesículas autofágicas (AVs)	LC3-II; Rab7 (AVs maduras)

Tabla M8. Marcadores empleados en la detección de orgánulos celulares.

9.2.3 Procedimiento

Tras homogenización de una hemicorteza bajo las condiciones descritas en el apartado 9.1.3 se obtiene la fracción microsomal, que se somete a centrifugación a 100.000 xg. El pellet de membranas así obtenido se resuspende en 200 µl de del tampón isotónico, y a continuación se mezclan con el mismo volumen de iodixanol al 50% (p/v) a 4°C, obteniéndose una fase de 400 µl de iodixanol al 25%. Sobre esta fase de iodixanol al 25%, situamos 8 fases sucesivas de 200 µl con concentraciones decrecientes de iodixanol (22.5%; 20%; 17.5%; 15%; 12.5%; 10%; 7.5% y 5% (p/v)), obtenidas por dilución de iodixanol al 50% (p/v) en solución de trabajo isotónica.

Una vez construido el gradiente, lo centrifugamos a 50 000 xg durante 18 horas a 4°C produciéndose así un gradiente continuo por difusión. Seguidamente extraemos desde la parte superior del gradiente 10 fracciones consecutivas de 200ul cada una (no se observa pellet tras

MATERIALES Y MÉTODOS

centrifugar estos gradientes). Las fracciones así obtenidas se congelan a -40°C hasta su uso para el análisis de diferentes proteínas por western-blot.

9.2.4 Cálculo de la densidad en la que se diferencian las vesículas autofágicas en gradiente continuo de iodixanol

Aunque hemos empleado los gradientes de iodixanol para diferenciar vesículas autofágicas e intentar separarlas de otros compartimentos celulares, desafortunadamente no hemos conseguido una separación óptima de los compartimentos celulares estudiados. De hecho, tras fraccionar el contenido microsomal de células N2a o de cortezas de animales transgénicos hemos obtenido resultados muy similares en la colocación de los marcadores de vesículas autofágicas (LC3-II), lisosomas (LAMP-1) y cuerpos multivesiculares (Rab7), y por otro lado de los marcadores de retículo endoplásmico (Grp78), y trans-golgi (syntaxina 6).

Sin embargo, este método nos ha servido como una aproximación preliminar para estudiar la co-localización de marcadores de vesículas autofágicas y proteínas implicadas en el procesamiento del APP, así como para hacer un cálculo aproximado del rango de densidad en el que se diferencian las vesículas autofágicas. En este sentido, siguiendo el protocolo anterior, hemos fraccionado el sobrenadante post-nuclear de un lisado de células de neuroblastoma N2a. Posteriormente, hemos calculado en cada una de las fracciones aisladas tras 18 horas de centrifugación el índice de refracción (η), densidad (ρ) y concentración de iodixanol (g/100ml), basándonos en las relaciones detalladas por el fabricante (Sigma) (figura M11).

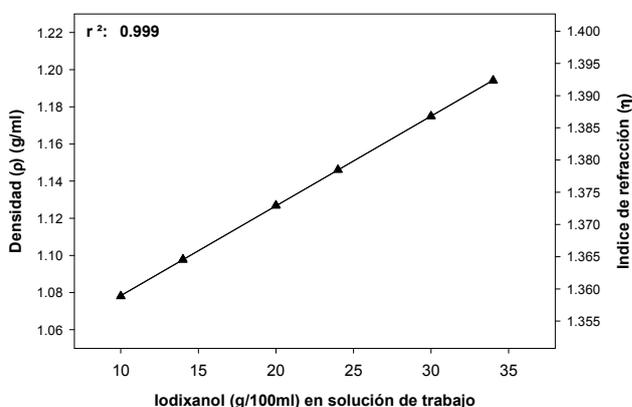


Figura M11. Relación de la densidad e índice de refracción con la concentración de iodixanol. De acuerdo con la información que acompaña Optiprep® (Sigma), hemos establecido una relación lineal entre la densidad ρ (g/ml) y el índice de refracción (η) de la solución con la concentración de iodixanol (g/100ml) en solución isotónica de trabajo.

Tras fraccionar el contenido microsomal de dos lisados celulares N2a en gradientes de iodixanol obtuvimos los resultados mostrados en la tabla M9, en la que la concentración inicial de iodixanol corresponde a la de las fases superpuestas durante la construcción del gradiente, y la final, a la calculada para cada fracción en función de su índice de refracción después de centrifugación a $50\,000\text{ xg}$ durante 18 horas.

Fracción (200µl/fracción)	Iodixanol inicial (g/100ml)	Índice de refracción (η)	Densidad (ρ) (g/ml)	Iodixanol final (g/100ml)
1	5	1.3540	1.0612	6.46
2	7.5	1.3566	1.0700	8.29
3	10	1.3596	1.0806	10.48
4	12.5	1.3627	1.0914	12.70
5	15	1.3655	1.1011	14.71
6	17.5	1.3685	1.1114	16.86
7	20	1.3724	1.1250	19.66
8	22.5	1.3755	1.1357	21.88
9	25	1.3840	1.1650	27.94
10	25	1.3977	1.2126	37.76

Tabla M9. Índice de refracción, densidad y concentración de iodixanol en fracciones de un gradiente de iodixanol en células N2a. Tras fraccionar el contenido microsomal de un cultivo de células N2a en gradiente continuo de iodixanol, hemos determinado el índice de refracción (η) para cada una de las fracciones obtenidas del gradiente. En función de η hemos determinado la densidad (ρ) (g/ml) y la concentración de iodixanol en cada fracción (g/100ml). Las fracciones marcadas en rojo corresponden con aquellas inmuno-positivas para LC3-II mayoritariamente.

Como se puede observar en la representación gráfica de los datos mostrados en la tabla M9 (figura M12), la concentración de iodixanol aumenta de forma lineal hasta la fracción nº 8, y a partir de ella produce un aumento exponencial, posiblemente originado por la tendencia de las moléculas de iodixanol a sedimentar durante la centrifugación.

Tras analizar la expresión del marcador de vesículas autofágicas LC3-II en cada una de las fracciones del gradiente de iodixanol pudimos constatar que dichas vesículas muestran capacidad para flotar en las fracciones 2, 3 y 4 mayoritariamente. Por tanto, bajo las condiciones experimentales descritas, las vesículas autofágicas de las células N2a se diferencian en un rango de densidad aproximado de 1.070 a 1.091, con un pico en 1.08 g/ml, coincidiendo con el rango en el que se diferencian los sinaptosomas en un gradiente discontinuo de ficoll PM400 (descrito en el apartado anterior).

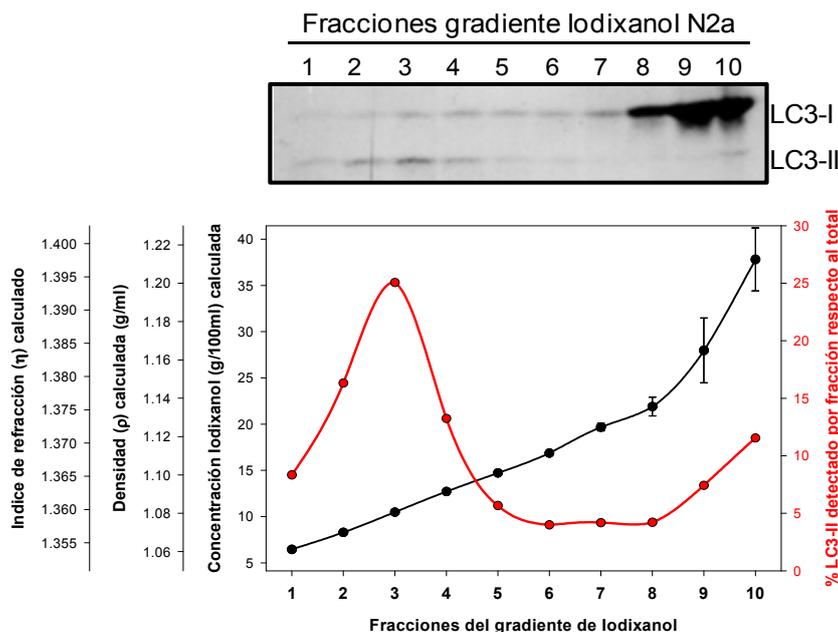


Figura M12. Representación de la concentración de iodixanol calculada y el porcentaje de LC3-II detectado en fracciones de gradiente de iodixanol para N2a. Representación de los datos mostrados en la tabla M9 para η, ρ (g/ml) y la concentración calculada de iodixanol (g/100ml) en cada una de las fracciones obtenidas del gradiente discontinuo de iodixanol tras fraccionar el contenido microsomal de células N2a. En rojo se representa el porcentaje de LC3-II en cada fracción respecto al total en todo el gradiente.

9.3 Obtención de una fracción enriquecida en vesículas autofágicas en gradiente de ficoll PM400

9.3.1 Reactivos:

- Tampón de trabajo isotónico: 0.32M sacarosa (Applichem), 1mM EDTA (Sigma), 1mM EGTA (Sigma) en 20mM Tris-HCl pH 7.5.
- Solución ficoll PM400 (Amersham) al 16% (p/v) en solución de trabajo.
- Solución ficoll PM400 (Amersham) al 7% (p/v) en solución de trabajo.
- Inhibidores de proteasas (Roche).
- Inhibidores de fosfatasa: Na_3VO_4 (Sigma) 1mM y NaF (Sigma) 50mM.

9.3.2 Fundamento:

Como ya hemos comentado anteriormente el fraccionamiento en gradiente continuo de iodixanol no nos permitió una separación óptima de los compartimentos celulares estudiados,. Por tanto optamos por usar un protocolo específico para aislar vesículas autofágicas (AVs) usando gradientes discontinuos de metrizamida, que permiten aislar dos fracciones de vesículas autofágicas (pesadas y ligeras), y una de lisosomas (Yu et al., 2004; Yu et al., 2005; Yang et al., 2009).

El método, descrito por primera vez por Wattiaux et al., 1978 y Marzella et al., 1982, es sencillo y semejante al empleado para obtener sinaptosomas, aunque con modificaciones. En este caso, el extracto mitocondrial crudo se obtiene por centrifugación a más velocidad (17000-

24000 xg). El contenido de membranas precipitado se fracciona en un gradiente de metrizamida con al menos 4 fases: 26%; 24%; 20% y 15% (p/v). Este gradiente se centrifuga a 100 000 xg, 1-3 horas, para conseguir que las vesículas floten hasta las interfases. Concretamente, en la interfase 15-20% se diferencia una fracción ligera de vesículas autofágicas (LAV), y en la interfase 20-24% una pesada (HAV). Por otra parte, los lisosomas se diferencian en la interfase 24-26% (Yu et al., 2005; Yang et al., 2009). De acuerdo con Wattiaux R. et al. 1978 concluimos que la interfase 15-20% equivale a un intervalo de densidad de 1.076 a 1.106 g/ml; la interfase 20-24%: 1.106 a 1.130 g/ml; y la interfase 24-26%: 1.130 a 1.142 g/ml.

Estos resultados son parcialmente semejantes a los obtenidos previamente en el gradiente de iodixanol (apartado 9.2.4), ya que la fracción ligera de vesículas autofágicas se diferencia en el mismo rango de densidad. Sin embargo en los gradientes de iodixanol no se diferencian 2 fracciones de vesículas autofágicas, probablemente debido a las distintas muestras de partida utilizadas en cada caso.

Puesto que la densidad en la que se aíslan las vesículas autofágicas es muy aproximada al rango donde se aíslan los sinaptosomas en gradiente discontinuo de ficoll PM400, hemos optado por adaptar la metodología de aislamiento de sinaptosomas con objeto de obtener a partir del mismo procedimiento una fracción enriquecida en autofagosomas.

9.3.3 Procedimiento

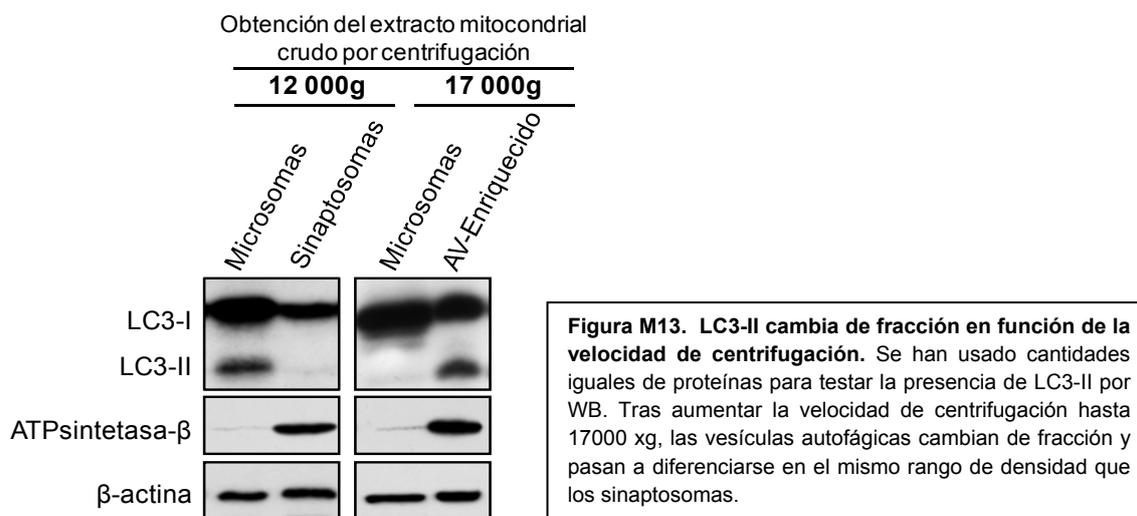
El protocolo empleado es muy similar al descrito anteriormente para el aislamiento de sinaptosomas en gradientes de ficoll PM400. Partimos igualmente de una hemicorteza de ratón (80-100mg) que homogenizamos en tampón isotónico de trabajo en presencia de inhibidores de proteasa y fosfatasas. La diferencia está en que el sobrenadante post-nuclear se centrifuga a **17 000 xg** durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose un pellet que corresponde al extracto mitocondrial crudo enriquecido en vesículas autofágicas y lisosomas (Yu et al., 2005).

Posteriormente este pellet se resuspende en ficoll PM400 al 16%(p/v) y se centrifuga en un gradiente discontinuo de ficoll (descrito en el apartado 9.1) a 100 000 xg durante 45 minutos a 4°C. Aspiramos 600µl de la interfase del 13%-7% como muestra enriquecida en vesículas autofágicas. Finalmente la fracción microsomal y soluble S1 se obtienen del modo descrito en el apartado 9.1.

MATERIALES Y MÉTODOS

9.3.4 La presencia de LC3-II cambia de fracción en función de la velocidad de centrifugación.

Con el fin de constatar la presencia mayoritaria de vesículas autofágicas en la interfase del 13%-7% del gradiente discontinuo de ficoll PM400, hemos comparado la fracción sinaptosomal versus la microsomal obtenidas con el protocolo para el aislamiento de sinaptosomas, así como la fracción enriquecida en autofagosomas versus la fracción microsomal obtenidas tras aplicar el protocolo específico para aislar vesículas autofágicas en gradiente de ficoll PM400. Para este ensayo hemos comparado cantidades iguales de proteínas, y hemos analizado la expresión de LC3-II (figura M13).



El aumento de la velocidad de centrifugación de 12 000 a 17000 xg para precipitar el extracto mitocondrial crudo, supone un cambio crítico en la distribución de las vesículas autofágicas (figura M13).

10. Electroforesis de proteínas en gels de poliacrilamida-SDS.

10.1 Reactivos

- Acrilamida (Serva) al 30% (p/v).
- N,N'-metilén-bis-acrilamida (Sigma) al 1% (p/v).
- Tampón para gel de corrido (4x): SDS al 0.4% en 1.5M Tris-HCl pH 8.8.
- Tampón para gel de empaque (2x): SDS al 0.2% en 0.25M Tris-HCl pH 6.8.
- Tetrametiletiléndiamina TEMED (Sigma).
- Persulfato Amónico (Sigma) al 50% (p/v) en agua.
- n-Butanol (Panreac).
- Tampón de carga 8X para muestras: 4% SDS (Applichem), 10% (v/v) 2-mercaptoetanol (Sigma), 20% de glicerol (Merk), 0.05% azul de bromofenol (Sigma) en 125 mM Tris-HCl pH 6.8.

- Tampón de glicina (Applichem) para electroforesis: 190mM glicina, SDS 0.1% (p/v) en 25 mM Tris-HCl pH 8.4.
- Tampón de tricina (Applichem) para electroforesis: 0.1% SDS en 100mM tricina pH 8.45.

10.2 Procedimiento

Para preparar geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones combinamos los reactivos según la tabla M10. Una vez combinados todos los reactivos, vertemos la mezcla entre los cristales molde (Bio-Rad) compatibles con el sistema de electroforesis Mini-Protean 3 (Bio-Rad).

Cuando polimeriza el gel de corrido, preparamos el gel de empaque combinando los reactivos según la tabla M10, vertemos el contenido sobre el gel de corrido e introducimos los peines molde suministrados por Bio-Rad. Según los peines utilizados podemos obtener geles con capacidad para 5-15 muestras.

Reactivos	Gel de separación de proteínas (Gel de corrido o <i>Running gel</i>) Volumen final: 5ml (1 gel; grosor 1mm)				Gel de empaque
	Concentración de acrilamida % (p/v) en gel				
	10%	12%	14%	16%	(3%)
Acrilamida (30%)	1.69 ml	2 ml	2.4 ml	2.67 ml	0.5 ml
Bis-acrilamida (1%)	0.66 ml	0.79 ml	0.92 ml	1.05 ml	0.5 ml
Tampón gel de corrido/empaque	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml	2.5 ml
Agua	1.40 ml	0.96 ml	0.43 ml	0.03 ml	1.5 ml
PSA (50%)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabla M10. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS. Al cambiar el volumen de acrilamida, bisacrilamida y agua podemos conseguir geles con acrilamida al 10, 12, 14 y 16%.

Cuando el gel de empaque termina de polimerizar, procedemos a retirar los peines, y acoplamos los geles al sistema de electroforesis Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Acto seguido, añadimos a la cubeta el tampón para electroforesis, asegurando en todo momento el contacto de los geles con dicho tampón.

Referente a las muestras objeto del estudio, habitualmente empleamos **pooles de 3 a 5 animales de distintas edades y genotipos (WT o PS1xAPP)** para el estudio de distintos marcadores por WB. Por este motivo, no especificamos este detalle en la sección de resultados, a no ser que se modifique esta regla general. Al repetir los experimentos

MATERIALES Y MÉTODOS

cambiamos las muestras que forman parte de cada pool para confirmar los resultados con grupos de animales distintos.

Las muestras se mezclan con tampón de carga 8X antes de cargarse en el gel. Normalmente, no hervimos las muestras antes de la electroforesis ya que muchas se encuentran en SDS 4%-Urea 8M. Al aumentar la temperatura, la urea produce cianato (HCNO), que reacciona con los grupos ϵ -NH₂ de la lisina bloqueando su carga, lo que finalmente originaría agregación proteica. La electroforesis se desarrolla rutinariamente a amperaje constante de 20mA durante aproximadamente 1 hora, aunque cuando utilizamos un tampón de electroforesis con tricina, cambiamos las condiciones a voltaje constante de 90V durante aproximadamente 2 horas.

11. Separación de las isoformas del péptido β -amiloidé en geles de poliacrilamida-SDS-UREA

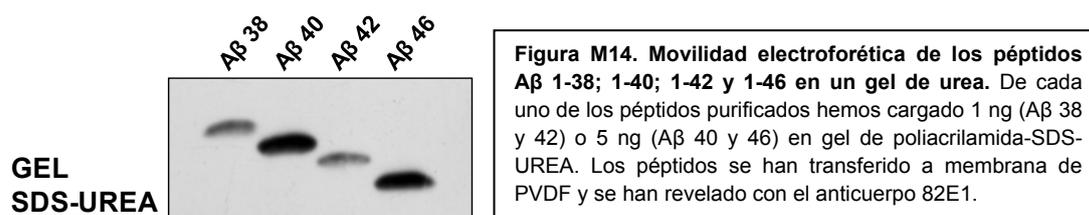
11.1 Reactivos

- Urea (Panreac)
- Solución al 58% (p/v) acrilamida (Serva) y 1.8% (p/v) bis-acrilamida (Sigma) en agua (60% T 3% C).
- Solución al 57% (p/v) acrilamida (Serva) y 3% (p/v) bis-acrilamida (Sigma) en agua (60% T 5% C).
- Tampón para gel de corrido (4x): Solución 0.4M ácido sulfúrico (Panreac) y 1.6M Tris (Sigma); pH 8.1.
- Tampón para gel de empaque (2x): Solución 0.8M Bis-tris (Sigma) y 0.2M ácido sulfúrico (Panreac); pH 6.7.
- Tampón para gel de carga o "well buffer" (2x): Solución 0.72M Bis-tris (Sigma) y 0.32M Bicina (Sigma); pH 7.7.
- Solución SDS (Applichem) 10% (p/v).
- Solución de Persulfato amónico (Sigma) al 10% (p/v).
- Tetrametiletiléndiamina TEMED (Sigma).
- Tampón de electroforesis para el ánodo: Solución 200mM Tris (Sigma) y 50mM ácido sulfúrico (Panreac); pH 8.1.
- Tampón de electroforesis para el cátodo: Solución 200mM Bicina (Sigma), 0.25% (p/v) SDS (Applichem) y 100mM NaOH (Applichem); pH 8.2.
- Tampón de carga (2X) para muestras: 0.72M Bis-tris (Sigma), 0.32M Bicina (Sigma), 30% (p/v) sacarosa (Sigma), 2% (p/v) SDS (Applichem) y 0.015% (p/v) azul de bromofenol (Sigma).

11.2 Fundamento

La validez de las técnicas estándares de electroforesis, basadas en la relación entre la movilidad electroforética y el peso molecular del marcador está generalmente limitada a

proteínas y péptidos mayores de 10 KDa. Sin embargo los péptidos de menor tamaño y/o con un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos habitualmente no siguen esta relación. En este sentido, las diferentes isoformas del péptido β -amiloide (Abeta 1-38; 1-40; 1-42; 1-43; 1-46; 1-48; 1-49) constituyen un ejemplo extremo de comportamiento electroforético anormal (Takami et al., 2009), y a pesar de presentar diferentes pesos moleculares suelen diferenciarse en un gel de poliacrilamida-SDS como una única banda que ronda entre 4 y 4.5 KDa,. Además hay formas truncadas como el Abeta 1-28, que en geles de poliacrilamida-SDS deberían comportarse como un péptido de 2 KDa y sin embargo tienen una movilidad electroforética menor que la de las formas no truncadas (Kawooya et al., 2003).



Para el análisis de los péptidos amiloides se realiza un tratamiento de las muestras con urea 8M (Bentahir et al., 2006) que permite mantener el péptido Abeta desnaturalizado y desagregado, mientras que el uso de SDS como único detergente puede llevar a la formación de agregados tetraméricos (Soreghan et al., 1994; Kawooya et al., 2003; Rangachari et al., 2007). Por esta razón y, debido a la presencia de placas del β -amiloide en las áreas cerebrales de nuestros ratones transgénicos, hemos optado rutinariamente por mantener las proteínas totales extraídas solubilizadas en SDS 4%-Urea 8M. Además la adición de urea 8M a los geles de poliacrilamida-SDS, permite diferenciar las diferentes isoformas de este péptido, gracias a la diferente movilidad electroforética que presentan en presencia de urea. Sin embargo, esta separación es un tanto atípica, puesto que los péptidos de mayor longitud (Abeta 1-46; 1-48 y 1-49) presentan mayor movilidad electroforética que los de menor longitud (Abeta 1-38; 1-40; 1-42) (figura M14).

En este sentido, se ha sido descrito que en presencia de urea existe mejor relación de la movilidad relativa con la hidrofobicidad de los péptidos de A β que con el tamaño de los mismos (Wiltfang et al., 1997; Kawooya et al., 2003). La hipótesis de estos autores propone que la interacción de los residuos apolares con moléculas de SDS en presencia de urea está potenciada, mientras que la de los residuos hidrofílicos estaría disminuida. De este modo, los péptidos amiloides con mayor carga de aminoácidos hidrofóbicos presentarían a priori mayor carga negativa, lo que explicaría su mayor movilidad electroforética. Al observar la secuencia de las distintas isoformas del péptido A β (tabla M11), podemos comprobar que la mayor longitud en estos péptidos es debida de forma casi exclusiva a la presencia de aminoácidos apolares en el extremo carboxilo terminal lo que explica su distribución tras la electroforesis en presencia de urea.

MATERIALES Y MÉTODOS

PEPTIDO	SECUENCIA (NH ₂ -peptido-COOH)
Abeta 1-38	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG
Abeta 1-40	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG VV
Abeta 1-42	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG VV IA
Abeta 1-43	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG VV IA T
Abeta 1-45	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG VV IA T V
Abeta 1-46	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG VV IA T V IV
Abeta 1-48	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG VV IA T V IV IT
Abeta 1-49	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGG VV IA T V IV IT L

Tabla M11. Secuencia aminoacídica de los péptidos A β de diferentes longitudes. No se han incluido formas truncadas del péptido amiloide en esta tabla resumen.

En el transcurso de este trabajo, hemos usado geles de poliacrilamida-SDS-Urea para analizar el cambio en la proporción de los péptidos amiloides durante el envejecimiento de los ratones transgénicos. El método utilizado en este trabajo está basado en la técnica descrita por Klafki et al., 1996 con algunas modificaciones. El inconveniente de dicha metodología es que no permite resolver los péptidos amiloides de longitud superior al Abeta 1-46, lo que implica que en la banda reconocida como tal, se encuentran integrados tanto el Abeta 1-46 como las otras formas de mayor longitud.

11.3 Procedimiento

Al igual que en el caso de geles de poliacrilamida-SDS, para la elaboración de estos geles utilizamos moldes de cristal suministrados por Bio-Rad compatibles con el sistema de electroforesis Mini-Protean 3. Este tipo de geles los preparamos generalmente en moldes que nos permitan conseguir un grosor 0.75mm partiendo de los reactivos descritos al principio de esta sección.

En primer lugar preparamos el gel de corrido: 8M Urea; 9.5% acrilamida y 0.5% bis-acrilamida (10% T 5% C), 0.25% SDS en tampón Tris-H₂SO₄ pH 8.1. Para la construcción de este gel combinamos los reactivos en las proporciones detalladas en la tabla M12, sin añadir persulfato amónico (PSA) ni TEMED, para evitar la polimerización. Agitamos la mezcla durante 30 minutos hasta que la urea quede disuelta, añadimos los catalizadores, vertemos 5ml entre los cristales y esperamos la polimerización durante 30 minutos.

REACTIVOS	Gel de corrido (<i>Running gel</i>) Volumen para 2 geles de grosor 0.75mm (10ml)	Gel de empaque (<i>Stacking gel</i>) Volumen para 8-10 geles grosor 0.75mm (4ml)	Gel de carga (<i>Well gel</i>) Volumen para 8-10 geles grosor 0.75mm (4ml)
UREA	4.8g	-	-
Tampón gel de corrido/empaque/peine	2.5ml	2ml	2ml
Acilamida/Bis- acilamida	(60% T 5% C) 1.67ml	(60% T 3% C) 0.4ml	(60% T 3% C) 0.4ml
SDS al 10%	0.25ml	0.1ml	0.1ml
Agua	1.84ml	1.5ml	1.5ml
PSA (10%)	40µl	21µl	24µl
TEMED	5µl	7µl	8µl

Tabla M12. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS-UREA.

Una vez finalizada la polimerización del gel de corrido, preparamos el gel de empaque: 5.8% acrilamida y 0.2% bis-acrilamida (6% T 3% C), 0.25% SDS en un medio Bis-tris-H₂SO₄ pH 6.7 siguiendo las combinaciones descritas en la tabla M12. Vertemos 350 µl de la mezcla entre los cristales y esperamos 30 minutos hasta que polimerice.

A diferencia de los geles de poliacrilamida-SDS, en este caso, además de un gel de empaque, también debemos preparar un gel de carga, donde se introduce el peine molde adecuado para conseguir las hendiduras donde cargar las muestras. La composición del gel de carga es: 5.8% acrilamida y 0.2% bis-acrilamida, 0.25% SDS en un medio Bis-Tris-Bicina pH 7.7 (ver tabla M12).

Una vez preparado el gel, pasamos a mezclar la cantidad de muestra necesaria con tampón de carga en una proporción 1:1 (v/v). Para los geles de urea siempre hemos utilizado las mismas condiciones de electroforesis: voltaje constante (100V) durante 1 hora y 40 minutos.

12. Western-blot (WB)

12.1 Reactivos

- Solución al 0.1% (v/v) de Tween-20 (Sigma) en PBS (TPBS).
- Tampón de transferencia: 190mM glicina (Appllichem), 20% (v/v) metanol (Scharlau), 0.005% SDS (Appllichem) en 25mM Tris-HCl pH 8.4.
- Membranas de Nitrocelulosa; diámetro de poro: 0.45 micras (Hybond-C extra; Amersham).

MATERIALES Y MÉTODOS

- Membranas de PVDF; diámetro de poro: 0.45 micras (Inmobilon-P; Millipore).
- Solución Rojo Ponceau'S (Sigma) al 0.1% en ácido acético al 5% en agua.
- Leche desnatada (Bio-Rad) al 5% en TPBS.
- Anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano (DAKO Cytomatic).
- ECL-Plus (Amersham).
- Películas fotográficas (Hyperfilm-ECL; Amersham).
- Revelador (Kodak) y Fijador (Kodak).

12.2 Fundamento

Esta técnica comienza con la electroforesis de las proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS o poliacrilamida-SDS-Urea. Una vez terminada la electroforesis, transferimos las proteínas desde el gel hasta una membrana de nitrocelulosa o PVDF (según Towbin H et al., 1979) donde van a ser reconocidas por anticuerpos específicos. Las proteínas siguen desnaturizadas tras la transferencia, lo que garantiza el acceso libre de los anticuerpos primarios a los epítomos antigénicos. Posteriormente, utilizamos un anticuerpo secundario que reconoce la fracción constante de la inmunoglobulina correspondiente al anticuerpo primario. En nuestro caso el anticuerpo secundario va unido a la enzima peroxidasa de rábano, capaz de procesar un sustrato (ECL-plus) y originar un producto quimio-luminiscente que se utiliza para impresionar películas fotográficas. La señal detectada de este modo es proporcional a la cantidad de proteína específica de partida en la muestra.

12.3 Procedimiento

Una vez concluida la electroforesis, transferimos las proteínas a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (si la electroforesis previa es en geles SDS-Urea).

Para llevar a cabo la transferencia usamos el sistema en sándwich (Bio-Rad), en el que la membrana se pone en contacto con el gel, ambos son flanqueados por papel de filtro y esponjas, para finalmente quedar sujetos por un soporte plástico. La transferencia tiene lugar en una cubeta llena de tampón de transferencia, durante 90 minutos a 300 mA (amperaje constante).

Terminada la transferencia, habitualmente observamos las proteínas transferidas en la membrana mediante tinción con rojo Ponceau'S. Posteriormente, lavamos la membrana con PBS, y la bloqueamos con leche al 5% en TPBS durante 30 minutos-1 hora a T^a ambiente. Concluido el bloqueo lavamos la membrana en PBS, y la incubamos con el anticuerpo primario (en TPBS-leche al 1.5%) durante toda la noche a 4°C. La relación de los anticuerpos empleados y sus características más relevantes se detallan en la tabla M13.

En caso de electroforesis en geles SDS-Urea, las membranas de PVDF se activan con metanol antes de su uso y se hierven 5 minutos en PBS antes del bloqueo para descubrir los epítomos antigénicos de los péptidos de A β . Para estos geles hemos utilizado el anticuerpo

monoclonal 82E1 que reconoce desde el aminoácido 1 el extremo amino terminal del los péptido A β , lo que nos permite discriminar los péptidos completos de las formas truncadas.

PROTEÍNA/ ANTÍGENO DIANA	ESPECIE HUESPED	ESPECIFICIDAD	DILUCIÓN TRABAJO	BANDA RECONOCIDA	PROVEEDOR
	ANTICUERPO (clon/nomenclatura)				
Fosfo-Ser473- AKT	Conejo	Humana Murina	1/1000 (WB)	60 KDa	CELL SIGNALING
	Policlonal				
Fosfo-Thr308- AKT	Conejo	Humana Murina	1/1000 (WB)	60 KDa	CELL SIGNALING
	Policlonal				
Fosfo-Ser9- GSK-3 β	Conejo	Murina Humana	1/1000 (WB)	46 KDa	CELL SIGNALING
	Policlonal				
GSK-3	Ratón	Murina Humana	0.5 μ g/ml (WB)	51 KDa (GSK-3 α) 46 KDa (GSK-3 β)	UPSTATE
	Monoclonal 4G-1E				
Fosfo- Tyr1135/1136- IGF1- Receptor	Conejo	Murina Humana	1/1000 (WB)	95 KDa	CELL SIGNALING
	Policlonal				
Fosfo- Tyr1150/1151- Insulin- Receptor	Conejo	Murina Humana	1/1000 (WB)	97 KDa	MILLIPORE
	Monoclonal 10C3				
Fosfo-Thr212- Ser214-TAU	Ratón	Murina Humana	1/1000 (WB)	66 KDa	INNO- GENETICS
	Monoclonal AT100				
Fosfo- Ser199/202- Thr205-TAU	Ratón	Murina	1/1000 (WB)	66 KDa	THERMO SCIENTIFIC
	Monoclonal AT8				
β -actina	Ratón	Murina Humana	1/5000 (WB)	43 KDa	SIGMA
	Monoclonal AC-74				
β -amiloide	Ratón	Humana	1/5000 (WB e IP)	4.5 KDa (1-mer)	SIGNET
	Monoclonal 6E10				
β -amiloide (N-terminal)	Ratón	Humana	1/500 (WB)	4.5 KDa (1-mer)	IBL Immuno- Biological Laboratories
	Monoclonal 82E1				
APP y APP-CTFs (C-terminal)	Conejo	Murina Humana	1/6000 (WB)	100 KDa (APP) 14 KDa (C99) 12 KDa (C83;C89) 8 KDa (AICD)	SIGMA
	Policlonal				
β -amiloide (Formas oligoméricas)	Conejo	Humana	1/5000 (DB e IP)	99 KDa (22-mer) 54 KDa (12-mer) 27 KDa (6-mer)	INVITROGEN
	Policlonal -A11-				
β -amiloide (Formas oligoméricas)	Ratón	Humana	1 μ g/ml (DB)	-	Dr. William L. Klein ¹ Dra. Mary P. Lambert ¹
	Monoclonal Nu-1				
BACE-1	Conejo	Murina Humana	1/1000 (WB)	70 KDa	ABCAM

MATERIALES Y MÉTODOS

	Policlonal				
Flotilina-1	Ratón	Murina Humana	1/500 (WB)	48 KDa	BD Transduction Laboratories
	Monoclonal 18/Flotillin-1				
Caveolina-2	Ratón	Murina Humana	1/250 (WB)	20 KDa	BD Transduction Laboratories
	Monoclonal 65/Caveolin-2				
Grp-78	Conejo	Murina	1/5000 (WB)	78 KDa	STRESSGEN
	Policlonal				
ATP-sintetasa-β	Ratón	Murina Humana	1/10000 (WB)	55 KDa	BD Transduction Laboratories
	Monoclonal 10/ATP				
LC3 (isoforma B)	Conejo	Murina Humana	1/1000 (WB)	16 KDa (LC3-I) 14 KDa (LC3-II)	CELL SIGNALING
	Policlonal				
Sintaxina-6	Ratón	Murina Humana	1/5000 (WB)	31 KDa	BD Transduction Laboratories
	Monoclonal 30/Syntaxin6				
Sintaxina-13	Conejo	Murina Humana	1/1000 (WB)	31 KDa	SYSY Synaptic Systems
	Policlonal				
APP soluble-α	Ratón	Murina Humana	2 µg/ml (WB)	90 KDa (derivado de APP ₇₅₁)	IBL Immuno-Biological Laboratories
	Monoclonal 2B3				
Rab-7	Conejo	Murina Humana	1/1000 (WB)	23 KDa	CELL SIGNALING
	Policlonal				
Fosfo-Ser Neurofilamento	Ratón	Murina Humana	1/1000 (WB)	200 KDa (pesada) 160 KDa (media)	ABCAM
	Monoclonal SMI-31				
Total-Neurofilamento	Ratón	Murina	1/1000 (WB)	200 KDa (pesada) 160 KDa (media)	ABCAM
	Monoclonal SMI-312				
Kinesina-1 (cadena pesada)	Ratón	Murina Humana	1/1000 (WB)	120 KDa	ABCAM
	Monoclonal KN-01				
Presenilina-1 (C-terminal)	Ratón	Murina Humana	1/2000 (WB)	55 KDa (PS1fl) 20 KDa (PS1-CTF)	MILLIPORE
	Monoclonal PS1-loop				
Proton-ATPasa (Subunidad V0a1)	Conejo	Murina	1/1000 (WB)	116 KDa	SYSY Synaptic Systems
	Policlonal				

Tabla M13. Relación de anticuerpos empleados en WB, IP y DB, y características más relevantes.

¹ Northwestern University, Evanston, Illinois (USA).

Terminada la incubación con el anticuerpo primario, lavamos la membrana 3 veces con TPBS (5 minutos por lavado), y a continuación añadimos el anticuerpo secundario acoplado a

la peroxidasa. Todos los anticuerpos secundarios se incuban 1-2 horas a T^a ambiente en TPBS diluidos 1/6000.

Posteriormente la membrana se lava 3 veces con TPBS 5 minutos, y finalmente con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. La membrana se incuba con el reactivo ECL-plus que contiene el sustrato de la peroxidasa, y la señal quimioluminiscente se revela en cuarto oscuro utilizando películas fotográficas. Finalmente, la intensidad de las bandas de las películas se determinará utilizando el software PCBAS v2.0.

13. Dot-blot (DB)

13.1 Reactivos

- Solución al 0.1% (v/v) de Tween-20 (Sigma) en PBS (TPBS).
- Membranas de nitrocelulosa; diámetro de poro: 0.45 µm (Hybond-C extra; Amersham).
- Leche desnatada (Bio-Rad) al 5% en TPBS.
- Anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano (DAKO Cytomatic).
- ECL-Plus (Amersham).
- Películas fotográficas (Hyperfilm-ECL; Amersham).
- Revelador (Kodak) y fijador (Kodak).

13.2 Procedimiento

Sobre la membrana de nitrocelulosa se deposita una gota de muestra que contenga entre 0.5 y 1 µg de proteína (en un volumen final de 2 µl). Una vez que la gota se seca, bloqueamos la membrana en leche a 5% y la incubamos con el anticuerpo primario (Nu-1 o A11) a una dilución detallada en la tabla M13. A partir de este punto continuamos el protocolo descrito en el apartado 12.2.

Para el estudio mediante dot-blot de las formas oligoméricas de Aβ en las muestras S1 de animales WT y PS1xAPP empleamos una mezcla de 3 animales por edad y tipo (4 para 18 meses PS1xAPP). De cada muestra se hace un triplicado en la membrana de nitrocelulosa.

14. ELISA

14.1 Reactivos

- Kit para determinación colorimétrica de Aβ-42 humano mediante ELISA (Biosource).

14.2 Procedimiento

En primer lugar se prepara una curva patrón con el estándar de Aβ42 en el buffer de dilución suministrado con el kit. La curva construida va desde 0 pg/ml hasta 100 pg/ml en un volumen final de 50 µl/reacción. Se depositan 50 µl de cada estándar o muestra (50 µg de proteína soluble S1) en la placa de detección y a continuación se incuba durante 3 horas con

MATERIALES Y MÉTODOS

50 µl de la solución del anticuerpo primario a T^a ambiente (a la que se realiza todo el procedimiento).

Posteriormente se realizan 4 lavados de 5 minutos y se incuba durante 30 minutos con 100 µl de la solución del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. Pasado este tiempo hacemos de nuevo 4 lavados, y a continuación incubamos durante 30 minutos en la oscuridad con 100 µl del cromógeno estabilizado lo que hace que la solución cambie de azul a amarillo. Finalmente añadimos 100 µl de una solución para parar la reacción enzimática, y determinamos la absorbancia a 450nm, usando como blanco 200 µl de la solución del cromógeno más solución de stop.

15. Inmuno-precipitación (IP) de las formas oligoméricas del péptido amiloide

15.1 Reactivos

- Resina sefarosa unida a proteína-A (Sigma).
- Resina sefarosa unida a proteína-G (Sigma).
- Anticuerpos de unión a las formas oligoméricas del β-amiloide (ver tabla M13).
- Inhibidores de proteasas (Roche).
- EDTA (Sigma) 1mM, EGTA (Sigma) 1mM en PBS.
- Solución de CHAPS (Sigma) 1% (p/v); DOC (Sigma) 1% (p/v) en 1mM EDTA/1mM EGTA PBS.

15.2 Fundamento

Tanto la proteína A como la G se caracterizan por su capacidad para unirse a la cadena pesada de las inmunoglobulinas, variando mucho su afinidad en función de la especie animal de procedencia y de la IgG de la que se trate. De modo general, en nuestro laboratorio hemos usado la proteína A para los anticuerpos policlonales procedentes de conejo, y la proteína G para unir anticuerpos monoclonales procedentes de ratón y policlonales procedentes de conejo.

Para la inmuno-precipitación de las formas oligoméricas (y ocasionalmente monoméricas) del péptido Aβ empleamos resinas unidas a proteína-G o A. En primer lugar se pre-adsorbe el anticuerpo A11 (Aβ oligomérico) o 6E10 (Aβ total) a la resina-proteína-A/G. A continuación, la resina se incuba con la muestra correspondiente obtenida de los animales PS1xAPP. Finalmente, el análisis del inmunoprecipitado mediante western-blot, utilizando el anticuerpo 6E10, nos permitirá identificar las diferentes formas de Aβ reconocidas por estos anticuerpos.

15.3 Procedimiento

La proteína-G-sefarosa comercial se presenta como una pasta hidratada con etanol al 20%. Antes de su uso se resuspende en PBS y se centrifuga a 2000 rpm 4°C 5 minutos. El precipitado se vuelve a resuspender en PBS, para obtener una proporción del 50% (v/v).

Finalmente, añadimos etanol al 20% (v/v) para preservarla del crecimiento de microorganismos, y la conservamos protegida de la luz a 4°C.

La proteína-A-sefarosa es suministrada como un polvo. Antes de su uso disolvemos una pequeña cantidad de la misma (50-100mg) en 1-2ml de PBS y la dejamos en agitación a 4°C durante 2 horas. Finalizado este tiempo, se centrifuga y resuspende bajo las mismas condiciones que la proteína-G-sefarosa. La proteína-A-sefarosa no se conserva hidratada y se prepara una nueva para cada experimento.

Para preparar la columna de inmuno-afinidad, usamos 1 μ g del anticuerpo 6E10 o 2 μ g del anticuerpo A11 (ver tabla M13) por cada 20 μ l de resina al 50% (v/v). Una vez mezclados la resina y el anticuerpo, incubamos la mezcla 2 horas a 4°C en agitación, en un volumen final de 1ml de PBS. A continuación, lavamos 3 veces la resina en PBS con EDTA y EGTA 1mM, para eliminar el excedente de anticuerpo no unido. Finalizado este proceso, utilizaremos de 20 μ l de la resina al 50% (v/v) para inmunoprecipitar las formas de A β presentes en 50 μ g de proteína soluble (S1).

Para analizar el A β mono y oligomérico presentes en sinaptosomas de animales PS1xAPP partimos de 100 μ g de proteína total, basándonos en resultados previos que constatan que la cantidad de proteína soluble presente en los sinaptosomas es aproximadamente un 50% de la total (proteínas de membrana y proteínas solubles). 100 μ g de proteínas de sinaptosomas se resuspenden en 500 μ l de PBS conteniendo EDTA/EGTA e inhibidores de proteasas, y se sonicán a 100W en 3 pulsos de 15 segundos cada uno. Posteriormente centrifugamos a 30000 xg y a 4°C 1 hora, y empleamos el sobrenadante para la inmunoprecipitación añadiendo 20 μ l de proteína-A/G-sefarosa acoplada al anticuerpo 6E10 o A11.

Si usamos el pellet de membranas obtenido tras la centrifugación lo solubilizamos en CHAPS 1%-DOC 1% en PBS (en presencia de 1mM EDTA; 1mM EGTA e inhibidores de proteasas). Tras incubación con los detergentes 30 minutos a 4°C, diluimos la mezcla de CHAPS-DOC hasta 0.5% (p/v) en PBS, en un volumen final de 500 μ l. A continuación, añadimos 20 μ l de la columna de inmuno-afinidad previamente pre-adsorbida con 6E10 en las proporciones ya citadas. En este caso, no se podría emplear el anticuerpo A11 por ser muy sensible a detergentes.

La resina se incuba con la muestra en cuestión durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la resina se recupera por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se lava tres veces con PBS (conteniendo EDTA y EGTA 1mM), y el precipitado final se mezcla con 10 μ l de tampón de disociación 8X para WB. Para el análisis, se carga en gel de poliacrilamida y se sigue el protocolo de WB (apartado 12.3) usando el anticuerpo 6E10 para revelar.

MATERIALES Y MÉTODOS

En caso de hacer una inmuno-precipitación seriada, tomamos el sobrenadante inmuno-depletado de A β tras incubación con la resina y le añadimos 20 μ l de resina nueva acoplada al mismo anticuerpo. Volvemos a incubar toda la noche a 4°C y al día siguiente recuperamos la resina por centrifugación. Este proceso lo repetimos hasta 3 veces, y las resinas de las 3 inmuno-precipitaciones seriadas son igualmente analizadas mediante WB.

16. Determinación del colesterol total en preparaciones de membranas.

16.1 Reactivos

- *Amplex Red Cholesterol Assay* (Molecular Probes; Invitrogen).
- Mezcla Metanol (Merk):Cloroformo (Sigma) (2:1)
- Cloroformo (Sigma)
- Solución de ácido clorhídrico (Scharlau) 0.01N en agua.
- Isopropanol (Sigma)

16.2 Fundamento

Habitualmente para determinar el colesterol procedente de muestras biológicas se utilizan una serie de reacciones enzimáticas acopladas que originan una quinonaimina coloreada, cuya producción es directamente proporcional a la cantidad de colesterol de partida (figura M15). Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que la quinonaimina absorbe a 505nm, longitud de onda en la que la medida puede interferir con la autofluorescencia procedente de la propia muestra.

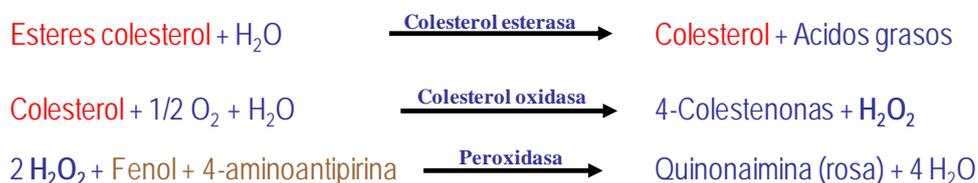


Figura M15. Conjunto de reacciones acopladas empleadas para la detección del colesterol en muestras biológicas.

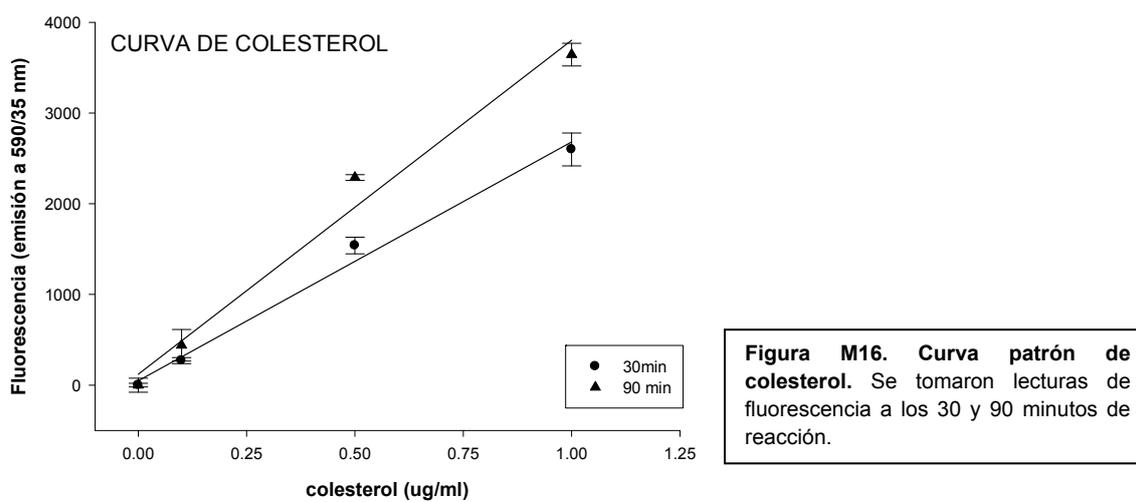
Para determinar el colesterol presente en las membranas lipídicas utilizamos el kit: *Amplex Red Cholesterol Assay* (Molecular Probes; Invitrogen). El método se basa en el sistema de reacciones acopladas descrito anteriormente, pero en la última reacción, el peróxido de hidrógeno reacciona con 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxacino (reactivo *Amplex Red*®) y origina un producto, resorufina, que se excita a 530-570nm y tiene un punto de emisión de fluorescencia máxima a 570-590nm, por lo que no interfiere con la autofluorescencia inespecífica de la muestra..

16.3 Procedimiento

Para desarrollar este ensayo hemos utilizado los componentes del kit y seguido las instrucciones del fabricante. La reacción se produce en un buffer 0.5M fosfato potásico pH 7.4, 0.25M NaCl, 25mM ácido cólico y 0.5% Tritón X-100, sobre el que se añaden las enzimas

colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidada y el reactivo *Amplex Red*. Se incuban 1 μ l muestra (0.5 o 1 μ g de proteínas de membrana) con 100 μ l de buffer de reacción a 37°C en ausencia de luz, y se toman lecturas de fluorescencia al cabo de 30 y 90 minutos.

Para empezar preparamos una curva patrón con cantidades crecientes de colesterol (0; 0.1; 0.5 y 1 μ g/ml) (figura M16). Tras varios ensayos constatamos que la fluorescencia detectada guarda una relación lineal hasta una concentración de 2 μ g/ml (concentraciones superiores muestran una cinética de saturación). Para calcular la concentración de colesterol presente en las muestras se interpolan sus valores de fluorescencia en la recta patrón



Todas las muestras se han analizado a los 30 y 90 minutos de empezada la reacción, obteniéndose valores de colesterol idénticos en ambos tiempos..

Además hemos utilizado 0.5 y 1 μ g de proteínas de membrana de partida con la finalidad de comprobar en todo momento la saturación de la reacción en función de la cantidad de muestra. En todos nuestros ensayos el punto de 1 μ g originó un valor de colesterol aproximadamente doble del obtenido para 0.5 μ g.

16.4 Extracción de lípidos de membranas.

Para confirmar los resultados obtenidos, hemos realizado una extracción previa de lípidos de las muestras estudiadas, para posteriormente volver a determinar la concentración de colesterol utilizando el mismo kit. La finalidad de repetir estos experimentos con una previa extracción de lípidos es no subestimar la concentración de colesterol calculada en las preparaciones de membranas después de la extracción de colesterol de las membranas con Tritón X-100 0.5% (buffer de reacción).

Para la extracción lipídica hemos utilizado un procedimiento estándar. A un volumen de homogenado de membranas al que previamente hemos determinado la concentración de proteínas por Lowry, añadimos 4 volúmenes de una mezcla cloroformo:metanol (1:2). Después de agitar fuertemente, añadimos 1 volumen más de cloroformo y un volumen de HCl 0.01N, y

MATERIALES Y MÉTODOS

agitamos de nuevo. A continuación, centrifugamos 10 minutos a 4°C y 2500 rpm para separar la fase orgánica de la fase acuosa. La fase inferior clorofórmica contiene el extracto lipídico, que se evapora bajo corriente de nitrógeno, para posteriormente resuspender el extracto seco en isopropanol. En nuestro caso, partimos de 250 µl de homogenado de membranas correspondientes a 250-300 µg de proteína de membrana. Los lípidos extraídos de este homogenado, se resuspenden en 100 µl de isopropanol,. Utilizamos 1ul de del extracto lipídico en isopropanol para la determinación de colesterol usando el mismo kit.

17. Ensayo de actividad enzimática β -secretasa

17.1 Reactivos

- Kit para determinación de actividad β -secretasa (R&D Systems)
- Solución CHAPS (Sigma) al 1%(p/v), DOC (Sigma) al 1% (p/v) y SDS (Applichem) al 2% (p/v) en PBS.
- Inhibidores de proteasas (Roche).

17.2 Fundamento

Para realizar este ensayo se solubilizan las membranas lipídicas en buffer de extracción (R&D Systems), o CHAPS 1%-DOC 1%-SDS 2% en PBS, con la finalidad de extraer BACE-1. El solubilizado obtenido se emplea para el ensayo de actividad que se realiza por la adición de un péptido específico (REEVNLDAEFKR), correspondiente a la secuencia de APP donde se produce el corte de la β -secretasa. Este péptido va acoplado a dos fluoroforos: EDANS y DABCYL. En la forma no procesada, la emisión de EDANS está apantallada por la proximidad física de DABCYL, que tiene un pico de absorción a 495nm, coincidiendo con la longitud de onda de emisión de EDANS. El procesamiento del péptido por BACE origina la separación de ambas moléculas, por lo que la emisión de EDANS deja de estar apantallada y es registrada por el lector de fluorescencia. El nivel de fluorescencia detectada a 495nm es proporcional a la actividad proteolítica sobre el péptido en cuestión, y por tanto a la actividad β -secretasa en la muestra analizada.

17.3 Procedimiento

A partir de preparaciones de membrana de animales PS1xAPP de 6 y 18 meses, solubilizamos las proteínas a una concentración de **1mg/ml** en buffer de extracción (R&D Systems), o en CHAPS 1%-DOC 1%-SDS 2% en PBS, durante 30 minutos a 4°C, en presencia de inhibidores de proteasas. El solubilizado se centrifuga a 13000 xg y se recoge el sobrenadante donde se determina la concentración de proteínas por micro-lowry.

Preparamos después dos pools con la misma concentración de proteínas solubilizadas de 3 animales de 6 o 18 meses PS1xAPP. Tomamos 50µl de cada pool y lo pasamos por duplicado a placas de 96 pocillos, donde añadimos 50µl del buffer de reacción 2x (R&D Systems) a cada reacción. Finalmente, añadimos 5µl del sustrato (excepto al control negativo pertinente) y se incuba en agitación a 37°C durante 2 horas. Se determina la lectura

de fluorescencia a 528 ± 20 nm a 1 y 2 horas, siendo la longitud de onda de excitación 360 ± 40 nm.

El incremento en las pendientes que relacionan la fluorescencia (F) frente al tiempo de incubación ($\Delta F/\text{hora}$) refleja la actividad β -secretasa. En todos los ensayos de este tipo hemos incluido un control negativo sin lisado celular y otro sin el sustrato específico.

17.4 Determinación de la actividad β -secretasa empleando dos buffers de extracción diferentes.

Al determinar la actividad β -secretasa empleando un buffer con detergentes, podemos encontrarnos con artefactos que podrían interferir en los resultados obtenidos, haciéndolos cuestionables. Por este motivo, decidimos emplear además del buffer de extracción suministrado por R&D Systems, una mezcla de CHAPS 1%-DOC 1%-SDS 2% en PBS, para solubilizar BACE-1 en las preparaciones de membranas.

El proceso de solubilización es muy diferente entre estas dos opciones; el buffer de extracción del kit comercial tiene baja capacidad para solubilizar BACE de las membranas, dejando un alto porcentaje sin solubilizar, a diferencia de la mezcla CHAPS-DOC-SDS que se mostró muy eficiente en la extracción de BACE. El hecho de que el buffer comercial tenga baja capacidad de solubilización de BACE-1 debe ser tenido en cuenta, ya que como se muestra en la sección de resultados, la solubilidad de las proteínas de membrana en detergentes (incluida la de BACE-1), puede cambiar durante el proceso de envejecimiento en los animales PS1xAPP. Por lo tanto, al determinar la actividad β -secretasa en muestras solubilizadas de animales jóvenes y viejos, podríamos incurrir en el error de subestimar la actividad enzimática en los viejos debido a este artefacto creado por el buffer de extracción.

El uso de la mezcla CHAPS-DOC-SDS, aunque solubiliza las proteínas de membrana prácticamente en su totalidad, tiene mayor poder desnaturizante, lo que también es un inconveniente. En este sentido, los valores absolutos de fluorescencia obtenidos al emplear esta mezcla han sido muy inferiores a los obtenidos al emplear el buffer de extracción proporcionado por *R&D Systems*, lo que es debido a la desnaturización de la enzima en el proceso de solubilización.

A pesar de ello hemos encontrado resultados muy semejantes de actividad β -secretasa en nuestros ensayos, aun habiendo empleado dos buffers de solubilización tan distintos.

Por otra parte, la lectura de fluorescencia obtenida para el control negativo con sustrato y sin solubilizado celular originó valores ligeramente superiores a los del control negativo con solubilizado celular y sin sustrato. En cualquier caso, con ambos controles negativos se obtienen valores de fluorescencia residual, que no se modifican entre 1 y 2 horas de incubación a 37°C .

18. Ensayo de actividad enzimática γ -secretasa

18.1 Reactivos

- Tampón hipotónico de trabajo: 1mM EGTA (Sigma), 1mM EDTA (Sigma) en 10mM Tris-HCl pH 7.6.
- Buffer citrato: 150mM citrato sódico (Sigma) en agua, pH 6.4 ajustado con ácido cítrico (Sigma).
- Inhibidor X de la γ -secretasa (L-685,458) 1mM en DMSO (Calbiochem).
- Inhibidores de proteasas (Roche)

18.2 Fundamento

El principio metodológico de este ensayo se basa en emplear los niveles endógenos de los fragmentos C-terminales de APP de nuestros animales transgénicos como sustrato para la actividad enzimática. El procesamiento por parte del complejo enzimático γ -secretasa sobre C99 da lugar al péptido A β y al fragmento AICD (dominio intracelular de APP que queda como una proteína soluble en el citosol). Tomamos la producción de AICD como medida de la actividad γ -secretasa. Teniendo en cuenta que los tejidos objeto de estudio son primero homogenizados en un tampón hipotónico, y las membranas centrifugadas y lavadas, la mayor parte de AICD presente inicialmente en la muestra debe quedar en el sobrenadante. Ya que utilizamos membranas precipitadas para los ensayos de actividad enzimática γ -secretasa, la interferencia del AICD endógeno de partida debería ser mínima.

Durante el desarrollo de este método, incubamos las membranas a 37°C durante dos horas en un tampón citrato ligeramente ácido para promover el procesamiento de C99 por la γ -secretasa y generar AICD. La validez de este ensayo requiere conocer los niveles endógenos de AICD presentes en la muestra de partida. Para ello hemos incluido varios controles negativos: 1º, AICD a tiempo cero; 2º, AICD después de incubar 2 horas en hielo; 3º, AICD después de incubar 2 horas en presencia de un inhibidor específico de la γ -secretasa.

18.3 Puesta a punto del ensayo de actividad enzimática γ -secretasa

Inicialmente recurrimos a un kit comercial con las mismas características al empleado para el ensayo de actividad β -secretasa. Sin embargo, los valores de fluorescencia obtenidos estaban en el nivel de los controles negativos, probablemente debido a una mala solubilización del complejo γ -secretasa.

Con el fin de desechar los artefactos creados por los detergentes, recurrimos a un ensayo enzimático donde no se añade sustrato exógeno. En este sentido, puesto que las muestras proceden de animales transgénicos para el gen APP, el sustrato de partida (APP o C99) se sobre-expresa. Sin embargo, al no poder controlar la cantidad de sustrato presente, no podemos asegurar que la enzima se encuentre funcionando a la velocidad máxima (V_{max}) bajo las condiciones empleadas en este ensayo.

Para determinar la concentración de proteínas y el tiempo de incubación adecuados para obtener niveles de AICD cuantificables sin llegar al estado de saturación, hemos empleado 2 cantidades de proteína de membrana diferentes (300 y 150 µg), y 2 tiempos de incubación a 37 °C (1 y 2 horas , ver figura M16).. Además hemos incluido varios controles negativos: AICD a tiempo cero (antes de que exista reacción), AICD producido durante 2 horas en hielo, y AICD producido durante 2 horas en presencia de un inhibidor de la γ-secretasa.

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura M17, hemos optado por emplear 150µg de proteína de membrana por reacción, e incubar durante 2 horas a 37°C. Pasado este tiempo se analiza la cantidad de AICD producido, comparando con los controles negativos. Dado que en las condiciones de trabajo elegidas no hemos detectado AICD en ninguno de los controles negativos, en los ensayos con múltiples muestras incluimos exclusivamente el control con el inhibidor específico de la γ-secretasa.

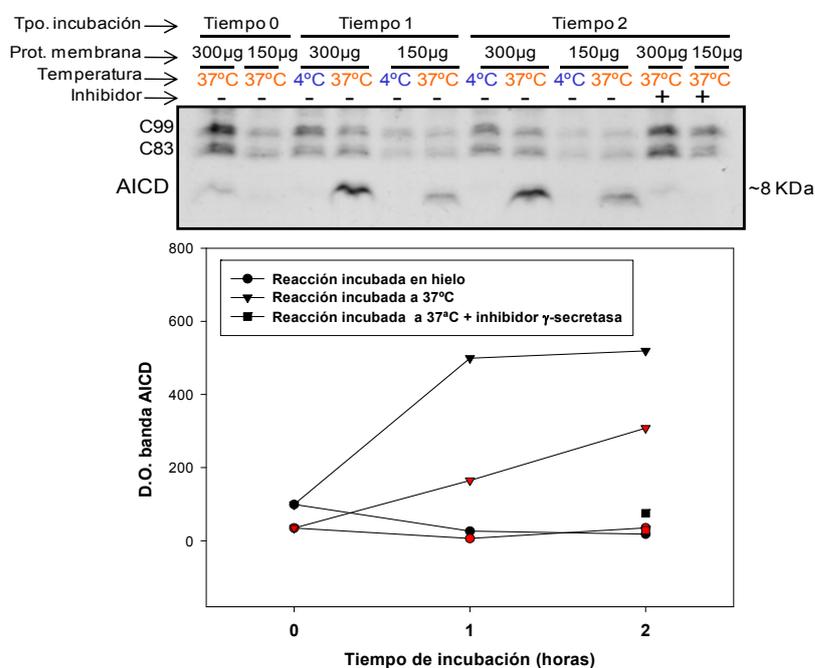


Figura M17. Puesta a punto del ensayo de actividad enzimática γ-secretasa. Se usaron 2 cantidades de proteínas: 150 µg (puntos en rojo) y 300 µg (puntos en negro) ,que se incubaron a 37°C durante 1 y 2 horas para obtener una señal óptima de AICD. Al usar 150 µg de proteína de membrana y un tiempo de incubación de 2 horas la reacción aun no está saturada y la intensidad de la banda de AICD es fácilmente cuantificable.

18.4 Procedimiento

Partimos de una hemicorteza de ratón transgénico que se homogeniza en Dounce´s en 2ml de buffer hipotónico de trabajo en presencia de inhibidores de proteasas, utilizando 50 pases del pistilo con menor diámetro (paso de luz: 0.089-0.14mm), y 20 pases del que tiene mayor diámetro (paso de luz: 0.025-0.076mm). El homogenado obtenido se incuba con el buffer hipotónico en hielo durante 15 minutos, y a continuación volvemos a pasar 20 veces el

MATERIALES Y MÉTODOS

pistilo de mayor diámetro. Se determina la concentración de proteínas por micro-lowry y se congelan las alícuotas de membranas a -80°C hasta su uso.

Para realizar el ensayo de actividad enzimática, partimos de $150\ \mu\text{g}$ de proteína de membrana en $50\ \mu\text{l}$ de buffer citrato. De cada muestra preparamos un duplicado para tratar una de ellas con el inhibidor específico de la γ -secretasa. Ambas se incuban a 37°C durante dos horas en presencia de inhibidores de proteasas, y al control negativo correspondiente le añadimos el inhibidor específico de la γ -secretasa (L-685,458) a una concentración final $100\ \mu\text{M}$ ($5\ \mu\text{l}$ de un stock 1mM en DMSO/reacción).

Terminada la incubación de 2 horas a 37°C , sonicamos el producto del ensayo enzimático (2 pulsos de 30 segundos a 100W) y centrifugamos a $30000\ \text{xg}$ durante 1 hora a 4°C . Tomamos $10\ \mu\text{l}$ del sobrenadante y analizamos por western-blot la producción de AICD durante la reacción. Para ello, sometemos la muestra a una electroforesis en gel de acrilamida al 16% (p/v) en tampón Tris-tricina. Las proteínas se transfieren a membrana de nitrocelulosa y se incuban con el anticuerpo contra APP-CTFs, que también reconoce AICD como una banda de $\sim 8\ \text{KDa}$ (ver figura M16).

El resto del sobrenadante no empleado para WB, así como los pellets de membrana se congelan a -80°C . En algunos casos, el producto de reacción AICD puede quedar asociado a las membranas lipídicas. Para evitar este problema, hemos sonificado el producto de la reacción antes de centrifugarlo. Aun así, en caso de no observar AICD en el sobrenadante, pasaríamos a comprobar su presencia en los pellets, también mediante WB.

19. Inmunohistoquímica para microscopía óptica de campo claro.

19.1 Reactivos

- Solución fijadora PLP: Paraformaldehído (Sigma) 4%, L-lisina (Sigma) 75 mM y metaperyodato sódico (Applichem) 10 mM en PBS.
- Solución de sacarosa (Sigma) al 30% en PBS.
- Solución 0.02% azida sódica (Sigma) en PBS.
- Solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% (v/v) y metanol al 10% (v/v) en PBS.
- Kit de bloqueo para avidina y biotina (Vector Laboratories).
- Solución 0.1% (p/v) azida sódica y 0.2% (v/v) tritón X-100 (Sigma) en PBS.
- Solución de rojo Congo al 20% (v/v) (Sigma), 0.03% (p/v) NaCl en etanol.
- ExtrAvidin®_Peroxidase (Sigma).
- 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorida (DAB) al 0.05% (p/v) en PBS.
- Sulfato amónico de níquel (Carlo Erba).
- Medio de montaje DPX (BDH).

19.2 Procesamiento del tejido

Los animales objeto de estudio se anestesiaron con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (*Dolethal*®, Vetoquinol) a una dosis de 60 mg/Kg y a continuación, se perfundieron transcárdialmente. Para ello, se abrió la aurícula derecha y con ayuda de una bomba de perfusión (Dinko, D25V) se inyectó en el ventrículo izquierdo en primer lugar tampón PBS durante un minuto hasta lavar completamente el sistema circulatorio de sangre, seguido de 180 ml de la solución fijadora PLP, durante 15 minutos. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en la misma solución fijadora durante una noche a 4°C.

Tras la post-fijación, los cerebros se lavaron con tampón PBS (10 minutos 3 veces) y se crioprotegieron para evitar daños en la estructura del tejido durante el proceso de congelación. La crioprotección se realizó mediante inmersión en solución de sacarosa al 30% hasta que el órgano se hunde en dicha solución. A continuación, los cerebros se congelaron con nieve carbónica durante 1 minuto y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Los cerebros se cortaron en un microtomo de congelación (Leica, CM-1325) en secciones de 50 µm de grosor en plano coronal y se almacenaron de forma seriada *free-floating* en pocillos que contenían PBS y 0,02% de azida sódica (para evitar el crecimiento fúngico). Las secciones se distribuyeron en 7 series, una serie en cada pocillo, de tal forma que dentro de una serie, los cortes consecutivos distaban entre sí 280 µm. Por tanto, cada pocillo contiene una representación rostrocaudal que representa 1/7 del total del cerebro. Esto permite la realización de una técnica distinta para cada serie (inmunohistoquímica simple, doble o múltiple, tinción histológica), de tal forma que podemos analizar múltiples marcadores y hacer un estudio comparativo en un mismo animal a lo largo del eje rostrocaudal. Las placas que contenían las secciones seriadas se almacenaron a 4 °C durante varios meses, renovando regularmente el tampón PBS con azida sódica.

19.3 Protocolo general para inmunohistoquímica

Partiendo de los cortes de tejido crioconservados:

1. Aplicamos tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampón PBS.
2. Inactivamos la peroxidasa endógena mediante incubación en peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 10%, durante 20 minutos.
3. Tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampón PBS.
4. Bloqueo de la avidina y la biotina endógenas, así como de las proteínas unidas a biotina, utilizando el Kit de bloqueo (Vector Lab.). Las secciones se incubaron tanto en avidina como en biotina durante 30 minutos (entre la incubación de avidina y biotina se realizó un lavado en PBS de 10 minutos).
5. Tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampón PBS.
6. Las secciones se incuban en el anticuerpo primario correspondiente bajo las condiciones indicadas en la tabla M14, en presencia de 0.1% de azida sódica y 0.2% de Triton X-100.

MATERIALES Y MÉTODOS

7. Tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampon PBS.
8. Incubacion en el anticuerpo secundario biotinilado contra IgG de la especie de procedencia del primario (Vector Lab.) durante 75 minutos, a una dilución 1:500 en 0.2% tritón X-100 a temperatura ambiente.
9. Tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampon PBS.
10. Incubacion con complejo estreptavidina-peroxidasa de rabano a una dilucion 1:2000 en 0.2% tritón X-100, durante 90 minutos a temperatura ambiente.
11. Tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampon PBS.
12. El producto de la inmunorreaccion se visualiza incubando primero las secciones en una solucion de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) al 0.05% durante al menos 5 minutos, para permitir su penetracion en todo el grosor del corte. Posteriormente, se añade H₂O₂ (al 30%) hasta una concentracion final del 0.03% y se monitoriza la intensidad del inmunomarcaje bajo control al microscopio (el tiempo de revelado fue variable en funcion del anticuerpo utilizado). Alternativamente, la reacción de la peroxidasa se intensifico con sulfato amonico de niquel (Carlo Erba) a una concentracion de 0.08% (Adams, 1981), añadido previamente a la solucion de DAB.

Todos los pasos de incubación y lavado se realizan con agitación constante (agitador de rotación circular Nahita 685 y asimiy asimor de rotacirot Heidolph Polymax 1040). Por otra parte, tras el revelado, las secciones se lavan con PBS (2 veces x 10 minutos), se montan en portaobjetos gelatinizados y se dejan secar en la estufa a 37°C durante un dia. A continuacion, las secciones se deshidrataron en una serie de etanol de graduación creciente (50°,70°,96° y absoluto) y se aclararon con xileno. Finalmente, se colocan los cubreobjetos utilizando el medio de montaje DPX (BDH).

PROTEÍNA/ ANTÍGENO DIANA	ESPECIE HUESPED	CONDICIONES DE INCUBACIÓN dilución/tiempo/ temperatura	PROVEEDOR
	Anticuerpos (clon-nomenclatura)		
APP y APP-CTFs (C-terminal)	Conejo	1:20000 48 horas; 22°C	SIGMA
	Policlonal		
p-Ser9 GSK-3β	Conejo	1:1000 24 horas; 22°C	ABCAM
	Policlonal		
LC3	Cabra	1:1000 24 horas; 22°C	SANTA CRUZ
	Policlonal		
Fosfo-Ser199/202- Thr-205 TAU	Ratón	1:500 24 horas; 22°C	PIERCE
	Monoclonal-AT8		
Neurofilamento	Conejo	1:5000 48 horas; 22°C	MILLIPORE
	Policlonal		
Sinaptofisina	Conejo	1:1000 24 horas; 22°C	ABCAM
	Policlonal		
VGLUT-1	Cobaya	1:10000 24-48 horas; 4°C	MILLIPORE
	Policlonal		

VGAT	Cobaya	1:5000 72 horas; 4°C	CALBIOCHEM
	Policlonal		

Tabla M14. Relación de los anticuerpos empleados en los estudios inmunohistoquímicos desarrollados en este trabajo, así como sus características más relevantes.

19.4 Contratación con Rojo Congo

En el caso de los marcadores neurofilamento y sinaptosfisina tras el revelado de la tinción inmunohistoquímica se realizó una contratación con rojo congo. El rojo congo es un colorante que se une de forma específica a las fibras de los depósitos amiloides en conformación de hoja plegada β . Igualmente puede marcar esta conformación en los ovillos neurofibrilares, ausentes en nuestro modelo.

A continuación se describe el protocolo utilizado:

1. Lavar las secciones tres veces en tampón PBS 0.1 M en agitación durante 10 minutos.
2. Incubar en rojo congo al 20% p/v durante 3 minutos en agitación.
3. Lavar el tejido tres veces en tampón PBS 0.1 M en agitación durante 10 minutos, para eliminar exceso de colorante.
4. Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
5. Deshidratación y montaje de los cubreobjetos con DPX.

20. Doble marcaje inmunohistoquímico para microscopía de fluorescencia

20.1 Reactivos

- Anti-IgG de conejo unido a Alexa 568 (Invitrogen)
- Anti-IgG de cobaya unido a Alexa 488 (Invitrogen)
- Solución al 3% de 1,4-diazabicyclo [2.2.2]-octano (DABCO) (Sigma) en PBS:glicerina (1:1).

20.2 Procedimiento

El protocolo aplicado para la técnica de inmunofluorescencia varía del utilizado para microscopía óptica de campo claro, ya que la naturaleza de los anticuerpos secundarios acoplados directamente a un fluorocromo, y la ausencia, en general, de revelado utilizando un complejo acoplado a peroxidasa, hace innecesario el bloqueo de peroxidasa endógena. Igualmente, en la mayoría de los casos el anticuerpo secundario está directamente acoplado a un fluorocromo por lo que no fue necesario el paso de bloqueo para la biotina endógena.

Para el doble marcaje fluorescente realizado en este trabajo, hemos desarrollado el mismo protocolo mostrado en el apartado 19.3, evitando los pasos de bloqueo de la peroxidasa y la avidina/biotina endógenas. En este caso, el paso de incubación con el anticuerpo primario se repite dos veces, una con anti-APP/APP-CTFs y otra con anti-VGLUT o VGAT bajo las condiciones descritas en la tabla M14. Del mismo modo, el paso de incubación con el anticuerpo secundario se realiza durante 75 minutos, a 22°C, en oscuridad y a una dilución

MATERIALES Y MÉTODOS

1/1000. Los anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados corresponden a anti-IgG de conejo unido a Alexa 568 (para reconocer APP/APP-CTFs) y anti-IgG de cobaya unido a Alexa 488 (para reconocer VGLUT o VGAT) (Invitrogen).

Las secciones se montan en portaobjetos gelatinizados y se cubren usando como medio de montaje PBS 0,1M y glicerina (1:1) y 3% de 1,4-diazabicyclo [2.2.2.]octano (DABCO), que mantiene la fluorescencia de las muestras durante mayor tiempo y evita el foto-blanqueamiento por el láser. Para finalizar, las secciones se analizaron en un microscopio láser confocal (Leica TCS-NT).

21. Microscopía electrónica.

Las secciones coronales de 50 µm de grosor se lavan en PBS y se incuban en 50 mM glicina durante 10 minutos con la finalidad de incrementar la unión al anticuerpo. Posteriormente se aplica el protocolo general de inmunohistoquímica descrito en el apartado 19.3. El anticuerpo contra APP/APP-CTFs se incubaba toda la noche a 4°C (1:20000) en 0.01% tritón X-100; BSA 1%(p/v) en PBS. Posteriormente, las secciones se lavan en PBS y se incuban con el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con nano-partículas de oro (1.4 nm) (1:100; Nanoprobes) durante una noche a temperatura ambiente. Después se realiza una post-fijación con glutaraldehído (Sigma) al 1% (p/v) y un lavado en 50 mM citrato sódico (Sigma). Para incrementar la intensidad de la señal se emplea HQ Silver™ Kit (Nanoprobes). Las secciones se montan en portaobjetos y se deshidratan como se describe en el apartado 19.3.

22. Cultivo de líneas celulares.

22.1 Neuroblastomas murinas N2a

Todas las células N2a empeladas en este trabajo han sido generosamente donadas por el Dr. Gopal Thinakaran (*University of Chicago*; USA).

El mantenimiento de las células N2a se hace de forma rutinaria en medio 50% DMEM rico en glucosa (PPA), 50% Optimen-I® (Gibco), suplementado con 2mM glutamina (PPA) y 5% suero bovino fetal (PPA), 100 U/ml de penicilina (PPA) y 0.01 mg/ml de estreptomycin (PPA). El mantenimiento se hace en flask de 75 cm² (Nunc) con 20 ml de medio a 37°C y 5% CO₂, y se subcultivan 1/10, dos veces a la semana.

Para realizar los experimentos de estimulación se ponen 200 000 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Nunc) 24 horas antes de la estimulación. En el caso de que el experimento se lleve a cabo en ausencia de suero, la deprivación se realiza al menos 12 horas antes de la estimulación en un medio DMEM rico en glucosa sin Optimen ni suero, aunque sí con antibióticos y glutamina. A continuación, se estimula con el extracto de proteínas solubles (S1) o bien con 5% suero fetal.

Alternativamente, usamos también células N2a establemente transfectadas con APP₆₉₅ con la mutación *swedish*. Para el mantenimiento de estas células empleamos el mismo medio descrito añadiendo G418 (PPA) (0.2mg/ml) como antibiótico de selección. Los experimentos de estimulación en estas células se realizan con las condiciones descritas para las células N2a; a la hora de estimular con drogas, empleamos 10µM de cloroquina (Sigma) durante 6 o 24 horas.

Para la recolección de las muestras después de la estimulación, en primer lugar recogemos el medio condicionado que se congela inmediatamente a -80°C. A continuación lavamos las células con 2 ml de PBS atemperado a 37°C, y añadimos 0.6 ml de *tripure*® por pocillo. Posteriormente incubamos en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente para garantizar la extracción completa de los componentes celulares por el reactivo. Finalmente utilizamos el protocolo de extracción de RNA y proteínas descrito en el apartado 3 de la metodología para obtener proteínas totales, que analizaremos mediante WB, y RNA, que utilizaremos para retrotranscripción y PCR a tiempo real.

22.2 Fibroblastos de embriones murinos MEF.

Las células MEF (*knock-out* para presenilina 1 y 2) establemente transfectadas con presenilina 1 humana empleadas en este trabajo han sido amablemente cedidas por el Dr. Bart De Strooper (*Katholieke Universiteit Leuven*; Bélgica).

El mantenimiento de estas células se hace en DMEM F-12 (PPA) suplementado con 10% suero fetal bovino, 2mM glutamina, 100 U/ml de penicilina y 0.01 mg/ml de estreptomina (PPA). Alternativamente, también hemos usado las células KO establemente transfectadas con presenilina-1 humana *wild-type*. En este caso, hemos añadido 3 µg/ml de puomicina (Sigma) como antibiótico de selección. Las células se mantienen en flask de 75 cm² (Nunc) con 20 ml de medio a 37°C y 5% CO₂, y se subcultivan 1/10, tres veces a la semana.

Para realizar los experimentos de estimulación, se ponen 200 000 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Nunc) 24 horas antes de la estimulación. Antes de la estimulación, cambiamos el medio, y posteriormene añadimos la droga (10µM de cloroquina (Sigma)). Una vez acabado el tiempo de incubación (6 o 24 horas) recolectamos el medio y lavamos las células con 2 ml de PBS atemperado a 37°C. Finalmente, extraemos la muestra en 0.6 ml *tripure*® y aplicamos el protocolo de extracción de RNA y proteínas totales descritos en el apartado 3 de la metodología.

23. Método de cuantificación de proteínas (Método de Lowry).

La determinación de la concentración de proteínas se realiza utilizando el método Lowry (Lowry et al., 1951), con la adición de 0.1% de SDS, si se trata de proteínas de membrana no solubilizadas previamente por otro detergente. La curva patrón se construye usando albúmina de suero bovina (BSA) con un rango de sensibilidad de 10-100 µg, y la absorbancia se determina a 750nm. La concentración de proteínas presente en un solubilizado

MATERIALES Y MÉTODOS

con SDS 4%-UREA 8M se determina añadiendo a la curva patrón el mismo porcentaje de urea y SDS que presentan las muestras.

Por otra parte, la concentración de proteínas presentes en algunas muestras más limitantes, como los sinaptosomas/microsomas aislados (ver apartado 10.1) donde el volumen de muestra obtenido es pequeño, se determina utilizando una variante denominada micro-lowry (modificación de Fryer H.J.L. y col., 1986), realizado en placas de poliestireno cristalino de 96 pocillos. En este caso, la curva patrón se hace en un rango de 1 a 10 μg , y la muestra se diluye de 10-40 veces en un volumen final de 100 μl . A cada reacción se le añaden 25 μl de la mezcla cobre-tartrato (CuSO_4 al 5%; Na K Tartrato al 10% y Na_2CO_3 al 10% en NaOH 0.5N en una razón 1:1:100) y se espera 10 minutos. A continuación añadimos el reactivo de Folin&Ciocalteu diluido en agua (1:1) y esperamos 20 minutos. Finalmente se procede a la lectura de la placa a 595nm.

24. Analisis estadístico

Todos los experimentos mostrados en este trabajo se han repetido al menos dos veces. Los valores representados corresponden a la media del grupo de animales estudiado \pm desviación estándar. Generalmente la mayor parte de los resultados se han expresado con respecto al grupo control (WT o PS1xAPP de 6 meses). El análisis estadístico se ha desarrollado con el programa estadístico *Statgraphics* v3.1. En primer lugar se comprobó que los datos se ajustaban a un modelo de distribución normal o Gaussiana (distribución que asumen los tests estadísticos más frecuentemente utilizados) y cuando no ha sido así se ha especificado explícitamente.

En el caso de una distribución normal, hemos comparado los datos mediante el test “t de Student”, cuando se comparaban dos poblaciones independientes, y hemos empleado ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey para la comparación de varios grupos entre sí. Todas las comparaciones se han hecho con respecto al grupo control, y cuando no hemos seguido esta regla se ha hecho constar.

Cuando la distribución de los datos no ha sido normal, hemos recurrido al test de Kruskal-Wallis para la comparación entre los distintos grupos de valores.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $p < 0.05$ (intervalo de confianza del 95%).

E. RESULTADOS

1. La concentración de formas oligoméricas solubles extracelulares del péptido β -amiloide aumenta durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP.

En los últimos años numerosas investigaciones han puesto de manifiesto el papel neurotóxico de las formas solubles y oligoméricas del péptido β -amiloide en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (para revisión, Sakono and Zako, 2010; Haass and Selkoe, 2007). Además, y como se detalla en la introducción, nuestros resultados demuestran la implicación de estas formas oligoméricas de A β en la activación citotóxica de la microglía (Jimenez et al., 2008). Por estos motivos hemos estudiado con detalle la presencia de estas especies del péptido A β en fracciones de proteínas solubles obtenidas a partir de las cortezas cerebrales de nuestro modelo de AD PS1_{M146L}xAPP_{751-SL}. Estas muestras (fracciones S1) se obtuvieron mediante ultracentrifugación a 100.000 xg del homogenado obtenido a partir de las cortezas cerebrales de animales PS1xAPP en un tampón isotónico libre de detergentes (ver materiales y métodos; apartado 6). De este modo, intentamos preservar las estructuras oligoméricas de A β presentes inicialmente en los tejidos y evitamos la extracción de β -amiloide de los depósitos insolubles extracelulares (placas) o intracelulares, presentes en nuestros animales desde edades tempranas (Blanchard et al., 2003).

Empezamos determinando mediante ELISA la concentración de A β 42 en las fracciones solubles S1 de animales PS1xAPP de 6 y 18 meses usando 4 animales de cada edad. Como se observa en la figura R1.A, la cantidad de A β 42 aumenta en torno a 13 veces de media en los animales de 18 meses (86.9 ± 54.2 pg/mg proteína soluble) con respecto a los de 6 meses (6.7 ± 1.3 pg/mg de proteína soluble), aunque los 4 animales de 18 meses analizados mostraron gran heterogeneidad en este incremento.

Por otra parte, la posible presencia de formas oligoméricas fue inicialmente determinada mediante dot-blots utilizando anticuerpos específicos (A11 y Nu-1) que reconocen específicamente epítomos conformacionales de los oligómeros del péptido A β (Kayed et al., 2007; Lambert et al., 2007). Esta aproximación experimental tiene como ventaja que no requiere condiciones desnaturalizantes para el análisis de los posibles oligómeros. Sin embargo, no permite distinguir las especies oligoméricas presentes en la muestra. Para este estudio hemos utilizado un pool de 4 animales PS1xAPP de cada edad (6, 12 y 18 meses) y tipo (WT y PS1xAPP). Como se muestra en la figura R1.B, en los animales WT y PS1xAPP de 6 meses no se detectó señal específica (asumiendo que la señal obtenida en WT corresponde a la no específica).

RESULTADOS

Mientras que los animales WT no tuvieron diferencia significativa asociada al envejecimiento, los animales PS1xAPP de 12, y más prominentemente los de 18 meses, mostraron un claro aumento en la señal obtenida (a los 18 meses, la señal detectada es en torno a 10 veces mayor a la de los animales WT de 6 meses, figura R1.C). Estos resultados demuestran que el A β oligomérico soluble aumenta significativamente en los animales PS1xAPP durante el proceso de envejecimiento.

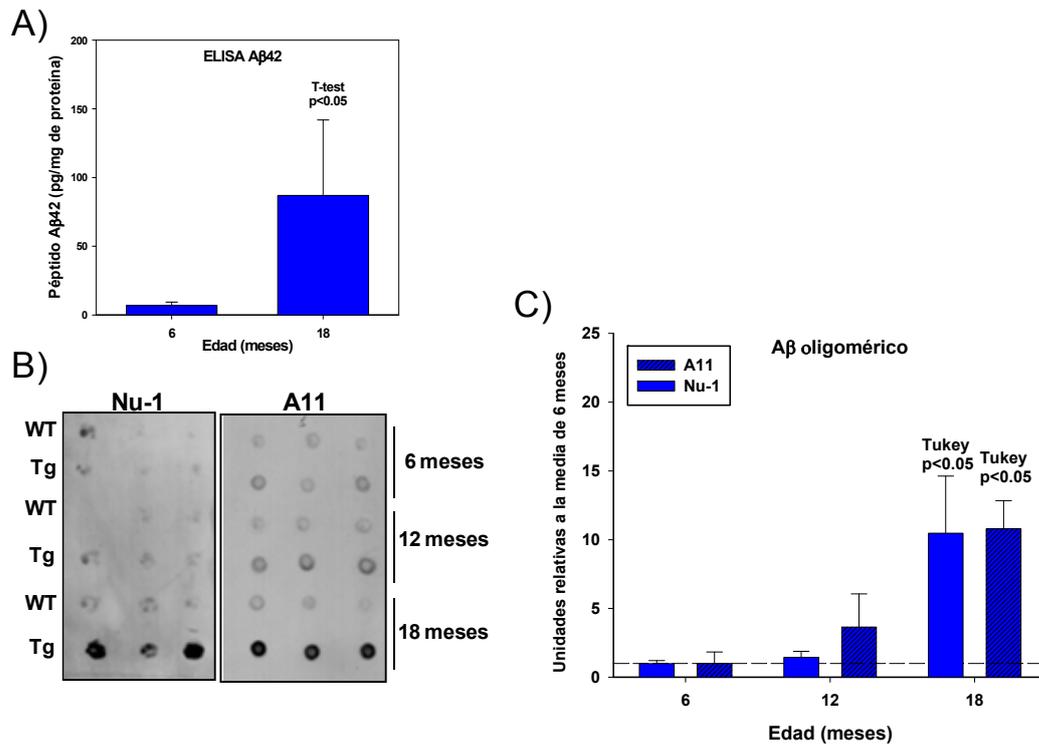


Figura R1. Cuantificación del péptido A β soluble y de sus formas oligoméricas en las fracciones S1 de los animales PS1xAPP. A) A β 42 detectado mediante ELISA en fracciones de proteínas solubles S1. La concentración de A β 42 está incrementada en torno a 13 veces en los animales de 18 meses PS1xAPP con respecto a los de 6 meses. B) Dot-blot representativo empleando anticuerpos específicos para reconocer epítomos conformacionales de A β oligomérico (A11 y Nu-1). Cada punto corresponde a un pool de 4 animales diferentes y se presenta por triplicado. C) Cuantificación de la señal específica obtenida mediante dot-blot en B. Los animales PS1xAPP de 18 meses muestran un aumento significativo en la cantidad de A β oligomérico soluble con respecto a los de 6 meses. T-test o Tukey $p < 0.05$, cambios significativos con respecto a WT de 6 meses.

Posteriormente, pasamos a caracterizar las formas oligoméricas presentes en los animales PS1xAPP de 18 meses. En primer lugar estudiamos los mismos extractos de proteínas solubles S1 mediante Western-Blot (WB). Para ello, 20 μ g de proteína soluble se sometieron a electroforesis en geles al 16%-poliacrilamida-SDS. El anticuerpo usado fue 6E10, que reconoce el péptido A β y otras formas solubles derivadas del APP, como APP α soluble. En la figura R2 se muestran los resultados obtenidos tras analizar las fracciones S1 de un animal WT de 6 meses y 3 animales

PS1xAPP de 6 y 18 meses. En los animales PS1xAPP de 6 meses aparece una banda predominante de alto peso molecular (en torno a 110KDa) ausente en el animal WT, que corresponde a la forma soluble APP α derivada del procesamiento del trasngén humano APP₇₅₁. En los animales de 18 meses se observan además bandas adicionales de Mr 24, 50, 60 y 100 KDa aproximadamente, que podrían corresponder a formas oligoméricas del péptido amiloide resistentes a SDS. Sin embargo, de los 3 animales de 18 meses estudiados, solo uno de ellos presentó de forma clara todas estas formas adicionales reconocidas por 6E10, lo que demuestra que en animales viejos la producción de oligómeros del péptido amiloide es heterogénea.

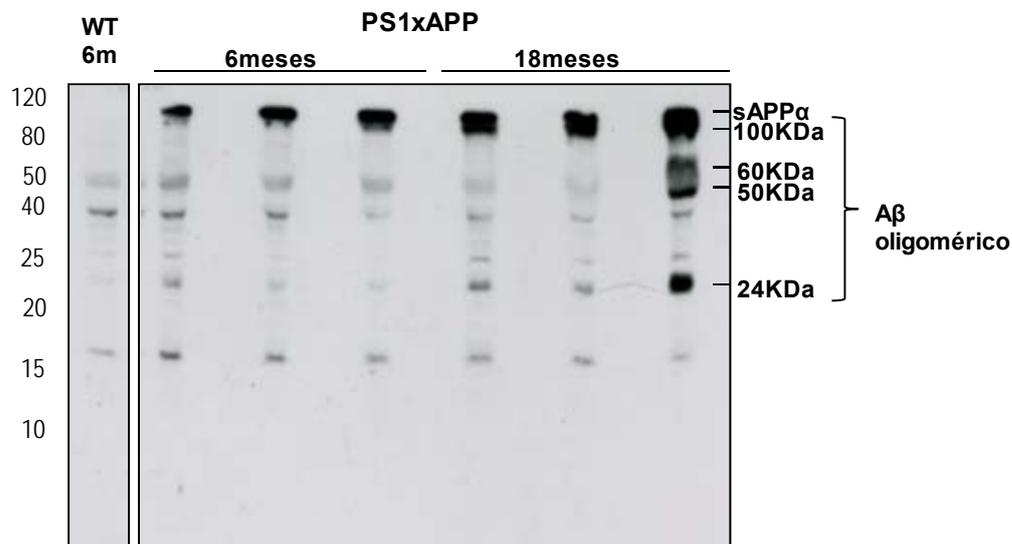


Figura R2. Estudio de las fracciones solubles S1 de los animales PS1xAPP mediante WB con el anticuerpo 6E10. Tras electroforesis en gel al 16%-poliacriladima-SDS, en los animales PS1xAPP de 6 meses se observa una banda predominante que corresponde al péptido APP α soluble. Además uno de los animales de 18 meses muestra varias bandas adicionales reconocidas por 6E10 (24, 50, 60 y 100KDa), posiblemente formas oligoméricas del péptido A β .

Para confirmar que las proteínas adicionales reconocidas en PS1xAPP de 18 meses eran formas oligoméricas de A β , procedimos a identificarlas mediante ensayos de inmunoprecipitación empleando el anticuerpo A11 pre-adsorbido a proteína G o proteína A-sefarosa. Partimos de una mezcla de fracciones S1 de 3 animales PS1xAPP de 18 meses en los que previamente se habían detectado estos posibles oligómeros con el anticuerpo 6E10, y realizamos 3 inmunoprecipitaciones seriadas (ver materiales y métodos; apartado 15). Tras analizar los 3 precipitados obtenidos mediante WB utilizando geles al 16%-poliacrilamida-SDS obtuvimos los resultados que se muestran en la figura R3.

RESULTADOS

En primer lugar analizamos mediante WB el primer precipitado obtenido tras utilizar la proteína-G-Sefarosa (PGS), lo que nos hizo descartar la posible interferencia de APP α soluble en nuestros resultados (figura R3.A). Como control interno usamos la resina acoplada al anticuerpo sin la muestra, PGS+Ab. Posteriormente pasamos a analizar los 3 inmuno-precipitados mediante WB con 6E10, lo que nos permitió identificar formas oligoméricas de 50, 60 y 100 KDa específicamente reconocidas por A11. Finalmente, analizamos las 3 precipitaciones seriadas obtenidas con el anticuerpo A11 pre-adsorbido a Proteína-A-Sefarosa (PAS). Igualmente, empleamos 6E10 para WB, lo que nos permitió observar el oligómero de 24KDa y el de 100KDa específicamente reconocidos por A11 (figura R3.A). Por lo tanto, alternar proteína-G con proteína-A para la inmunoprecipitación nos ha permitido detectar todas las formas oligoméricas que se observaron inicialmente tras el análisis preliminar mediante WB de la fracción S1 de 18 meses. En estos experimentos, siempre hemos alternado un anticuerpo policlonal producido en conejo (A11) para la inmunoprecipitación, con un anticuerpo monoclonal producido en ratón (6E10 y anti-APP α soluble) para WB, con la finalidad de evitar que el anticuerpo secundario utilizado en WB reconozca las cadenas pesada (50 KDa) y ligera (25 KDa) de la inmunoglobulina usada para el ensayo de inmunoprecipitación.

En este sentido, algunas de las formas oligoméricas detectadas como las de 24, 50 o 60 KDa podrían confundirse fácilmente con las bandas correspondientes a las cadenas ligeras y pesada, respectivamente, del anticuerpo usado para la inmunoprecipitación. Sin embargo, al utilizar 3 inmunoprecipitaciones seriadas, se observa que las bandas correspondientes a las especies oligoméricas precipitadas por A11 se encuentran mayoritariamente en el primer precipitado, mientras que su señal disminuye o apenas se observa en los dos posteriores, por lo que concluimos que corresponden a los oligómeros de A β reconocidos por A11. Contrariamente, las bandas que corresponden a las inmunoglobulinas aparecen en los 3 precipitados con la misma intensidad (ver figura R3.A), diferenciándose fácilmente de las bandas específicas.

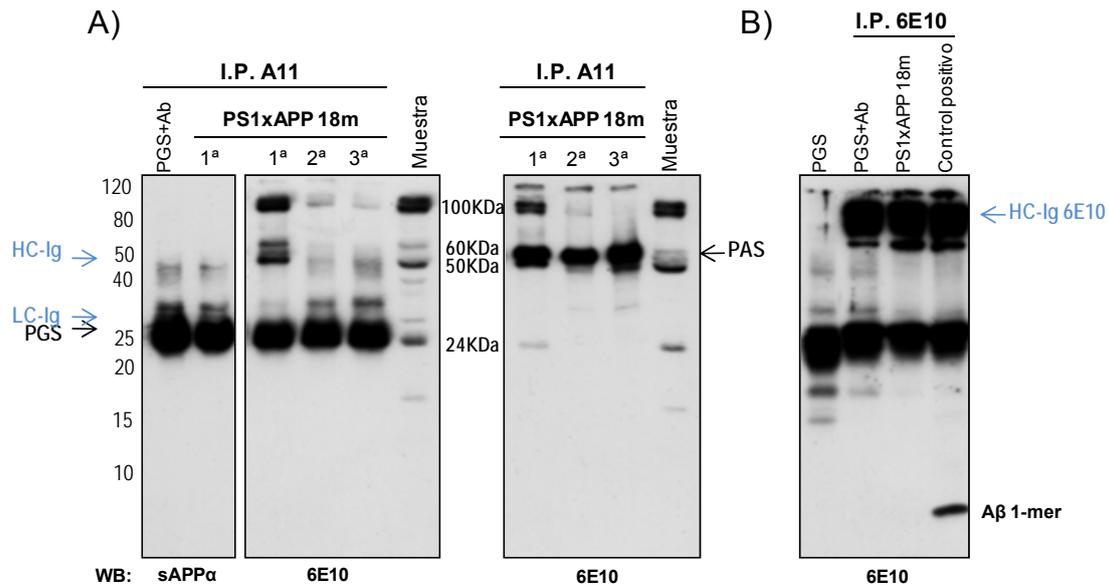


Figura R3. Inmunoprecipitación de las formas oligoméricas solubles del péptido Aβ en animales de 18 meses PS1xAPP. A) Inmuno-precipitaciones seriadas con el Anticuerpo A11 usando como resina Proteína-G/A-seferosa, y partiendo de 50µg de proteína soluble. El primer precipitado se analizó mediante WB empleando el anticuerpo anti-APPα soluble junto al control interno sin la muestra (PGS+Ab) para mostrar que A11 no reconoce sAPPα. Las 3 precipitaciones seriadas empleando PAS o PGS se analizaron con el anticuerpo 6E10 para detectar formas oligoméricas de Aβ precipitadas específicamente por A11, que se concentran mayoritariamente en el primer precipitado. B) Inmunoprecipitación con 6E10 a partir de la fracción soluble de 18 meses y de un control positivo que contiene Aβ monomérico. El precipitado también se analizó mediante WB con 6E10. No se observaron mono-, di-, tri-, o tetrameros de Aβ inmunoprecipitados en el animal de 18 meses con las condiciones experimentales ensayadas.

También hemos empleado el anticuerpo 6E10 para inmunoprecipitar las formas de Aβ presentes en el extracto S1 de los animales PS1xAPP de 18 meses, pero al analizar el precipitado mediante WB (con 6E10) no hemos obtenido resultados satisfactorios. La interferencia creada al emplear el mismo anticuerpo en WB e IP no nos ha permitido visualizar las formas oligoméricas inmunoprecipitadas entre 50 y 100 KDa. Como se muestra en la figura R3.B, la cadena pesada de la inmunoglobulina 6E10 muestra una movilidad relativa en torno a 100 KDa en lugar de 50 KDa. Puesto que esta banda puede observarse en todos los carriles excepto en el de resina que no lleva anticuerpo acoplado (PGS), pensamos que las cadenas pesadas de 6E10 podrían estar covalentemente unidas (*cross-linked*). Si esta unión tiene lugar durante la inmunoprecipitación o si se encuentra de este modo comercialmente es desconocido. La inmuno-precipitación con 6E10 nos ha permitido constatar que no existen monómeros (~4.5;KDa) u oligómeros de bajo peso molecular como di-, tri- o tetrameros (~9; ~13.5 y ~18KDa respectivamente) inmunoprecipitados con 6E10 (figura R3.B). De estos resultados podemos concluir que las formas solubles de Aβ mayoritarias en los animales PS1xAPP de 18 meses corresponden a oligómeros de

RESULTADOS

alto peso molecular resistentes a SDS, mientras que el monomero, dímeros y/o trímeros de A β están ausentes.

Para identificar con más precisión las formas oligoméricas de alto peso molecular, analizamos las formas solubles de A β inmunoprecipitadas mediante electroforesis en Tris-glicina con geles al 12%-poliacrilamida-SDS (figura R4.A), usando las mismas muestras que en los experimentos anteriores, más WT y PS1xAPP de 6 meses. Como se muestra en la figura R4.A (panel izquierdo), en el animal WT no aparecen formas oligoméricas tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo A11, apareciendo alguna a muy baja concentración en animales de 6 meses PS1xAPP. Coincidiendo con nuestros resultados previos, obtenidos mediante ELISA, se observa un fuerte incremento de estos oligómeros en las fracciones S1 de los animales de 18 meses. Por otra parte, el análisis de los oligómeros de A β en estos geles más abiertos corrobora que el anticuerpo A11 no reconoce APP α soluble, y resuelve con más precisión el peso molecular de estas formas oligoméricas en base a su movilidad relativa. Así pues, las formas inmunoprecipitadas muestran una movilidad relativa de 24; 47; 57; 90 y 96 KDa lo que sugiere que pueden ser oligómeros de A β de 6; 10; 12; 20 y 22-mer.

Tras inmunoprecipitación con 6E10 (figura R4.A; panel derecho), encontramos resultados muy similares a los obtenidos con A11. En este sentido, los anticuerpos 6E10 y A11 reconocieron las mismas formas oligoméricas en un medio no desnaturalizante. Sin embargo, la interferencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina 6E10 en WB no nos permitió observar las formas oligoméricas de 90 y 96 KDa, a la vez que la interferencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina nos evitó observar la forma de 24 KDa.

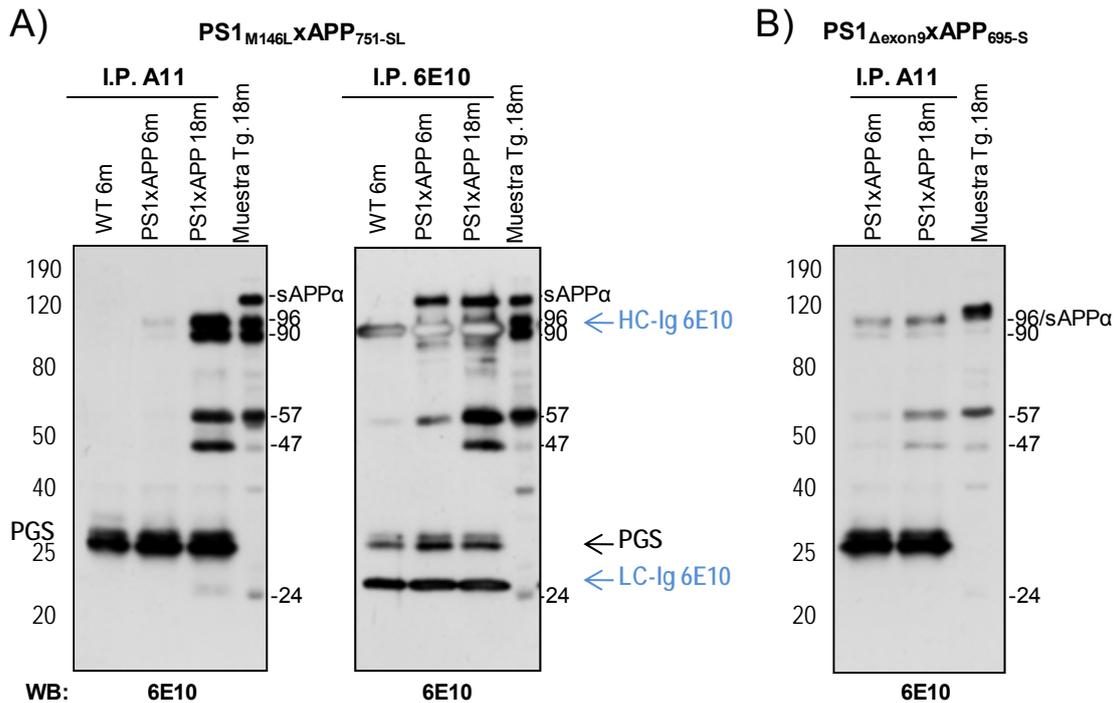


Figura R4. Inmunoprecipitación de oligómeros solubles de Aβ en animales de 6 y 18 meses PS1_{M146L}xAPP_{751-SL} y PS1_{Δexon9}xAPP_{695-S}. A) Inmunoprecipitaciones a partir de extractos solubles S1 de un animal WT de 6 meses, y PS1_{M146L}xAPP_{751-SL} de 6 y 18 meses con el anticuerpo A11. El análisis de las formas precipitadas en geles del 12%-poliacrilamida-SDS nos permitió comprobar que las formas oligoméricas de Aβ se encuentran de forma casi exclusiva en el animal PS1xAPP de 18 meses, y que éstas son compatibles con oligómeros de 6, 10, 12, 20 y 22-mer. B) Un estudio similar se llevó a cabo en proteínas solubles (S1) de animales PS1xAPP de 6 y 18 meses del modelo PS1_{Δexon9}xAPP_{695-S} en el cual encontramos a nivel cualitativo las mismas especies oligoméricas de Aβ precipitadas por A11 en los animales de 18 meses.

Finalmente, dada la gran diversidad de formas oligoméricas de Aβ que han sido relacionadas en la neurodegeneración propia de la enfermedad de Alzheimer (Kuo et al., 1996; Hoshi et al., 2003; Lesne et al., 2006; Shankar et al., 2008), repetimos el mismo ensayo de inmunoprecipitación en fracciones S1 de un modelo transgénico diferente al habitualmente empleado. Dicho modelo (PS1_{Δexon9}xAPP_{695-S}) tiene una delección completa del exón 9 de presenilina 1, y la forma transgénica de APP₆₉₅ (solo porta la mutación *Swedish*). Nuestros resultados muestran, a nivel cualitativo, las mismas formas oligoméricas solubles de Aβ en ambos modelo a los 18 meses de edad (figura R4.B), aunque la concentración de oligómeros en el modelo PS1_{Δexon9}xAPP_{695-S} parece ser notablemente inferior a la detectada en los animales PS1_{M146L}xAPP_{751-SL}.

2. Efecto del péptido A β extracelular soluble en la modulación de la vía PI3K-AKT-GSK-3 β en los animales PS1xAPP.

Aunque las evidencias sobre el papel neurotóxico que pueden jugar las especies oligoméricas solubles del péptido β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer son cada vez mayores (Gong et al., 2003; Lacor et al., 2004; De Felice et al., 2008; Shankar et al., 2008), los mecanismos moleculares por los que estas especies ejercen su acción tóxica son en gran medida desconocidos. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado recientemente que en animales PS1xAPP viejos existe una relación entre la aparición de estas formas oligoméricas de A β y la activación de la microglía hacia un fenotipo citotóxico, posiblemente involucrado en la neurodegeneración (Jimenez et al., 2008).

Además otros posibles mecanismos citotóxicos deben ser tenidos en cuenta en la EA. En este sentido, la proteína GSK-3 β (Glucogeno sintasa-quinasa-3 β) se encuentra implicada en la regulación de la apoptosis celular (Beurel and Jope, 2006) y desempeña un papel central en el desarrollo de la enfermedad (Balaraman et al., 2006; Lucas et al., 2001; Engel et al., 2006). En los últimos años han aparecido numerosas evidencias de que la vía de señalización PI3K-AKT-GSK-3 β se encuentra alterada en los enfermos de Alzheimer (Griffin et al., 2005; Forlenza et al., 2011), y de que podría estar modulada por el péptido β -amiloide (Zhao et al., 2008). Siguiendo esta línea, decidimos estudiar la actividad de GSK-3 β , y la influencia de los fragmentos derivados de la proteína APP en nuestro modelo PS1xAPP durante el envejecimiento. De este modo, intentamos establecer una relación entre el aumento de A β oligomérico, el eje PI3K-AKT-GSK-3 β y la muerte neuronal observada en los animales de 18 meses PS1xAPP (Schmitz et al., 2004; Jimenez et al., 2008).

2.1 La fosforilación en Ser9 de GSK-3 β está disminuida durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP.

La fosforilación en Ser-9 de GSK-3 β se encuentra mediada por AKT-1 e inhibe la actividad GSK-3 β . Al estudiar mediante WB la fosforilación de este residuo en extractos de proteínas totales de animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses (ver figura R4.A), encontramos un aumento significativo en la razón pSer9-GSK-3 β /GSK total en los animales PS1xAPP jóvenes (6 meses) con respecto a WT. Sin embargo, en animales viejos (18 meses), la fosforilación de GSK-3 β tiende a disminuir de manera

no significativa en los WT y sufre una clara disminución en los animales PS1xAPP con respecto a WT y PS1xAPP de 6 meses (figuras R4.A y R4.B).

Además realizamos estudios adicionales de inmunohistoquímica (IHC) en cortes de hipocampo, que muestran que la forma fosforilada en Ser-9 de GSK-3 β se localiza principalmente en los cuerpos neuronales del estrato piramidal (ver figura R4.C; detalle de C1 a C4). Los resultados de IHC han sido muy similares a los obtenidos mediante WB. Por un lado, en los animales PS1xAPP de 6 meses se produce un aumento en la inmunoreactividad para pSer-9-GSK-3 β en el estrato piramidal, y en interneuronas del *stratum oriens*, con respecto a los animales WT (figura R4.C; C1 y C2). Por otro lado, hemos observado una disminución en la inmunoreacción del estrato piramidal de los animales PS1xAPP de 18 meses con respecto a los animales WT tanto de 6 como de 18 meses (figura R4.C; C1, C3 y C4).

Estos resultados sugieren que la actividad GSK-3 β podría estar modulada durante el envejecimiento en las neuronas hipocámpales de los animales PS1xAPP. Para comprobar esta hipótesis, hemos estudiado los niveles y el grado de fosforilación de la proteína β -catenina en residuos específicamente fosforilados por GSK-3 β (Ser33/37/Thr41) y que están implicados en su degradación (Aberle et al., 1997); (Liu et al., 2002). En este sentido, aunque no hemos encontrado diferencias significativas en la razón fosfo/total, los niveles totales de β -catenina se encuentran ligeramente aumentados en los animales PS1xAPP de 6 meses. Por el contrario, en los animales PS1xAPP de 18 meses detectamos una fuerte caída en los niveles totales de β -catenina junto con un incremento considerable de la razón fosfo/total β -catenina (figuras R4.D y E). Por lo tanto, en congruencia con el grado de fosforilación detectado en Ser9-GSK-3 β , estos resultados sugieren que la actividad de GSK-3 β podría estar inhibida en los animales de 6 meses, e incrementada en los de 18 meses PS1xAPP. Además, esta hipótesis se encuentra abalada por un aumento en la fosforilación de los epítomos de tau reconocidos por los anticuerpos AT-100 y AT-8 en los animales PS1xAPP de 18 meses, con respecto a los jóvenes (ver figura R28; apartado 4 de resultados), ya que estos epítomos son sustratos directos de la actividad enzimática de GSK-3 β (Hanger et al., 2009).

RESULTADOS

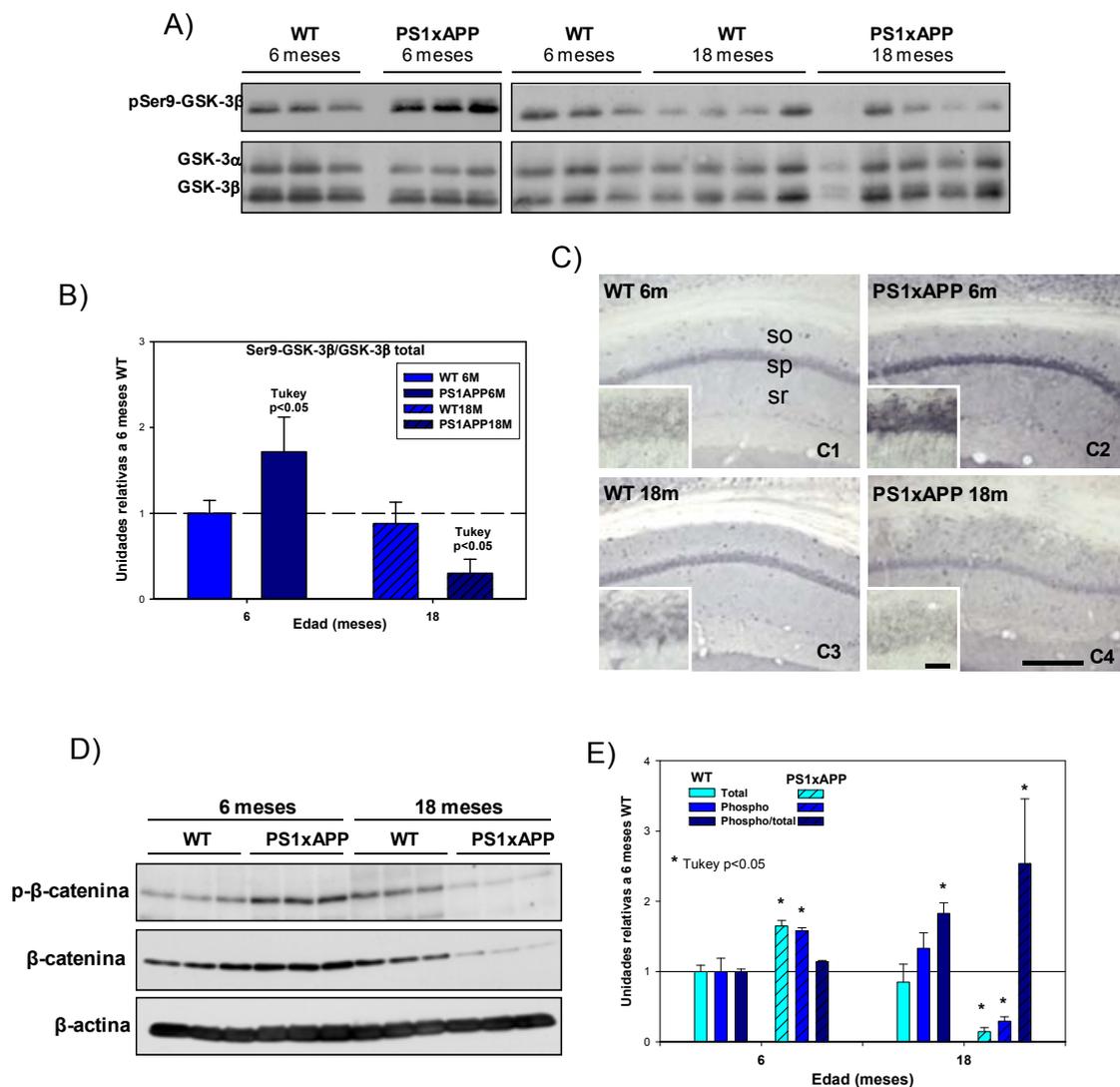


Figura R5. Estudio de la fosforilación en Ser-9 de GSK-3 β en animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses. A) WB representativo de GSK-3 β fosforilada y GSK total (α y β) en extractos de proteínas totales de hipocampo. B) Análisis de la densidad óptica de A. La razón pSer-9/GSK total aumenta en animales PS1xAPP de 6 meses, y disminuye significativamente a los 18 meses. C) Inmunohistoquímica en la región CA1 del hipocampo en animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses usando el anticuerpo pSer-9-GSK-3 β . En animales WT la inmunoreactividad se concentra en los cuerpos neuronales del estrato piramidal, interneuronas y en dendritas proximales. Los animales PS1xAPP de 6 meses muestran un aumento en la inmunoreactividad para pSer-9-GSK-3 β , mientras que los de 18 meses manifiestan una disminución. D) WB representativo de la forma fosforilada y total de β -catenina. E) Análisis de la densidad óptica de D. Coincidiendo con los cambios en la fosforilación de GSK-3 β , el nivel total de β -catenina se incrementa en los animales PS1xAPP de 6 meses, y disminuye a los 18 meses con respecto a WT de 6 meses. n= 3-5 animales diferentes de cada edad y tipo. sp: stratum pyramidale; so: stratum oriens; sr: stratum radiatum. Escala mostrada: 50 μ m. (*) Tukey p<0.05, cambios significativos con respecto a WT de 6 meses..

Por otro lado, si tenemos en cuenta el papel que juega la actividad GSK-3 β en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis modificando la expresión de factores pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Scali et al., 2006; Hongisto et al., 2003; Lonze and Ginty, 2002), estos resultados en parte podrían explicar, en primer lugar, la escasa degeneración neuronal observada en nuestro modelo a los 6 meses aun en

presencia de placas del β -amiloide (Ramos et al., 2006), y en segundo lugar, la pérdida neuronal observada en estos animales a los 18 meses (Jimenez et al., 2008).

2.2 El péptido APP α soluble y los oligómeros solubles de A β presentes en las fracciones S1 de los animales PS1xAPP pueden modular la fosforilación de GSK-3 β en cultivos de células N2a.

A la luz de los resultados descritos y teniendo en cuenta que la sobre-expresión de la proteína APP en los animales PS1xAPP tiene como consecuencia un fuerte incremento en la concentración de los fragmentos solubles derivados del procesamiento de APP (ver figura R2), sospechamos que el péptido sAPP α podría tener un papel en la regulación de la actividad GSK-3 β *in vivo*, a través del vía PI3K-AKT-GSK-3 β . En este sentido, ha sido descrito recientemente que los monómeros A β , actuando sobre receptores de membrana como los de insulina o IGF-1, activan dicha vía (Giuffrida et al., 2009). Para comprobar esta hipótesis recurrimos a ensayos *in vitro* en cultivos de neuroblastomas murinos N2a. Estas células se trataron con las fracciones solubles obtenidas de los animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses, y posteriormente, se analizaron los niveles de fosforilación de GSK-3 β (Ser-9), AKT (Ser-473 y Thr-308) y receptores de insulina (Tyr-1150/1151) e IGF-1 (Tyr-1135/1136). Para esta clase de ensayos utilizamos un pool de las fracciones S1 de 3 animales para cada edad (6 y 18 meses) y tipo (WT o PS1xAPP). En los animales PS1xAPP de 18 meses utilizados, comprobamos previamente mediante WB la presencia de formas oligoméricas de A β .

En primer lugar realizamos un ensayo de estimulación en ausencia de suero en el medio de cultivo, con la finalidad de conseguir que la fosforilación de GSK-3 β se encuentre en sus valores basales antes de la estimulación. De este modo, pudimos evaluar la capacidad de nuestras fracciones solubles S1 para inducir la fosforilación de GSK-3 β . En estos experimentos incluimos un control negativo sin estímulo, y un control positivo al que añadimos suero fetal al 5%. Tras añadir 50 μ g de proteínas solubles de WT ó PS1xAPP de 6 ó 18 meses a las células N2a en cultivo estudiamos mediante WB la fosforilación de AKT y GSK-3 β (figura R6.A). La estimulación con los extractos solubles de PS1xAPP se hace durante tiempos cortos (30 minutos) con la finalidad de evitar la posible saturación de la vía, disminución de la señal o la posible muerte neuronal inducida durante el tratamiento.

RESULTADOS

El tratamiento con la fracción S1 de los animales PS1xAPP de 6 meses produce un aumento, estadísticamente significativo, en la fosforilación en Ser-9 de GSK-3 β , mientras que el tratamiento con S1 de animales WT no indujo cambios con respecto al control negativo. Sin embargo, el tratamiento con la fracción soluble S1 de animales PS1xAPP de 18 meses no aumenta, o incluso induce una inhibición de la fosforilación por debajo del valor basal (figura R6.C), lo que indica la presencia de factores solubles capaces de bloquear la fosforilación de GSK-3 β .

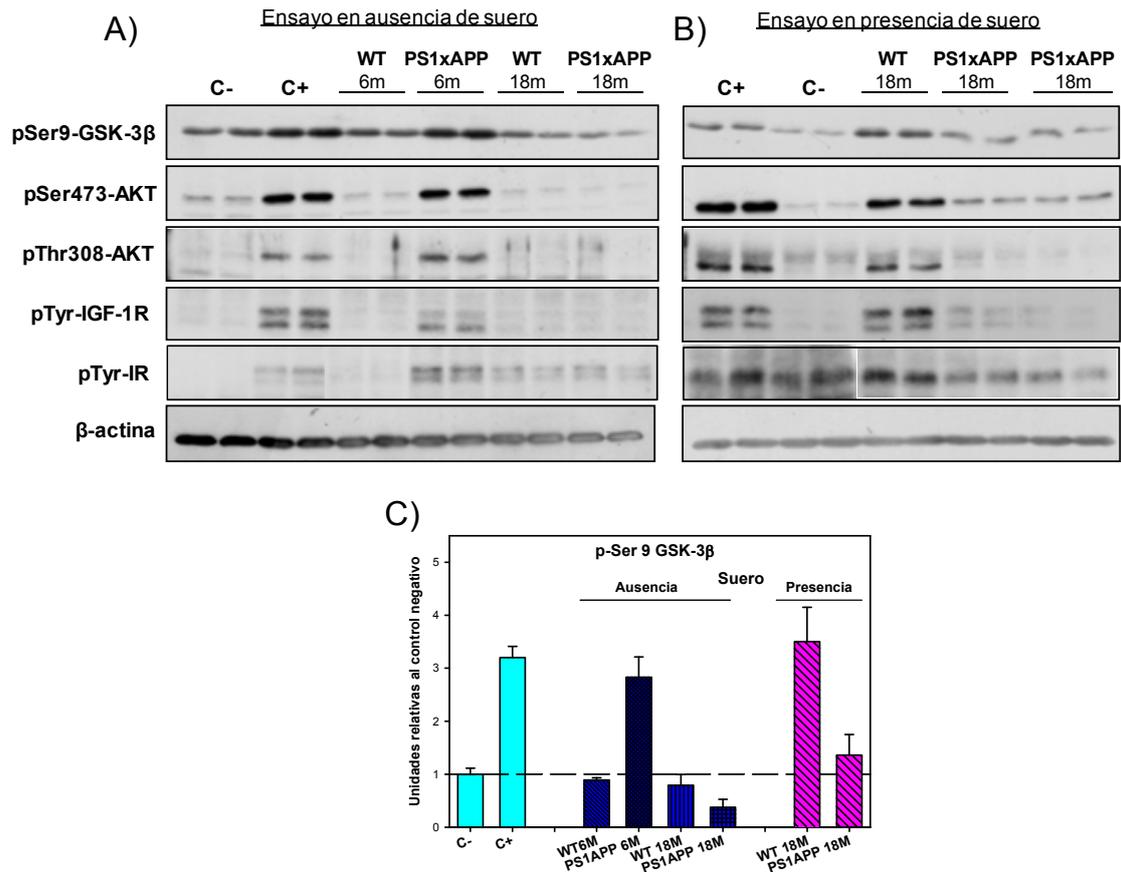


Figura R6. Efecto de las fracciones S1 de animales WT y PS1xAPP sobre la fosforilación de GSK-3 β en cultivos de N2a. A y B) WB representativo de fosforilación de GSK-3 β , AKT, IGF-1R e IR. Los cultivos se estimulan con la fracción S1 (50 μ g) de animales WT y PS1xAPP (6 y 18 meses) en un medio con suero (A) o sin suero (B). C+ : control positivo (adición de suero al medio); C- : control negativo (sin suero o inhibición mediada por LY294042). C) Representación cuantitativa de los cambios en fosfo-Ser9-GSK-3 β con respecto al control negativo en A y B. La fracción S1 de PS1xAPP de 6 meses induce la fosforilación de GSK-3 β alcanzando el valor del control positivo, mientras que en el caso contrario la fracción S1 de PS1xAPP 18 meses inhibe de forma significativa la fosforilación inducida por la presencia de suero en el medio. Los datos representados corresponden al promedio de 3 experimentos diferentes.

El aumento en los niveles de fosfoSer9-GSK-3 β , parece estar mediado por la activación de la vía PI3K-AKT. De hecho, la fosforilación de AKT en los residuos Ser-473 y Thr-308, mostraron un perfil de fosforilación muy similar al de GSK-3 β bajo

las mismas condiciones de estimulación, lo que demuestra el efecto específico de la fracción S1 de los animales PS1xAPP de 6 meses a la hora de modular la ruta PI3K-AKT-GSK, llevando en última instancia a la inhibición de GSK-3 β .

En segundo lugar, realizamos un experimento similar empleando únicamente las fracciones S1 de los animales de 18 meses tanto WT como PS1xAPP, con la finalidad de estudiar el posible efecto inhibitor en la fosforilación de GSK-3 β por parte de los factores solubles presentes en los estos animales. En este ensayo se determinó el posible efecto inhibitor de los S1 de 18 meses sobre la fosforilación de GSK-3 β inducida por 5% de suero. El control positivo utilizado es igual que en el ensayo anterior, mientras que para el control negativo, optamos por retirar el suero del medio ó, alternativamente, añadir el inhibidor de la PI3K LY294002 (figura R6.B). Como esperábamos, la adición de 50 μ g de la fracción S1 de 18 meses PS1xAPP dio lugar a una clara inhibición en la fosforilación de GSK-3 β con respecto al control positivo, mientras la fracción soluble de los animales WT no mostró efecto alguno en este sentido (figura R6.C). La fosforilación de AKT en los residuos Thr-308 y Ser-473 mostró de nuevo un perfil de fosforilación similar al de GSK en Ser-9, lo que sugiere que los factores solubles presentes en los animales PS1xAPP viejos son capaces de bloquear la vía completa PI3K-AKT-GSK-3 β , llevando en este caso a la activación de GSK-3 β .

Por otra parte, con la finalidad de conocer los receptores de membrana que podrían estar modulando el efecto observado en la fosforilación de GSK-3 β estudiamos el estado de fosforilación de los receptores de insulina (Tyr-1150/1151) e IGF-1 (Tyr-1135/1136). Ambos receptores están involucrados en la patología de Alzheimer y pueden modular la fosforilación de GSK-3 β a través de la vía PI3K-AKT-GSK ((Xie et al., 2002; Zhao et al., 2008). Tras la estimulación con las fracciones solubles de los animales WT y PS1xAPP ambos receptores mostraron claramente un perfil de fosforilación similar al producido para AKT o para GSK-3 β (ver figuras R6.A y R6.B). Estos resultados sugieren que los factores solubles de los animales PS1xAPP de 6 y 18 meses podrían modular la señalización de la vía PI3K-AKT-GSK-3 β a través de estos receptores, aunque no podemos descartar que otros receptores puedan estar también involucrados.

Para demostrar que el péptido APP α soluble está implicado en la activación de la vía PI3K-AKT-GSK, sometimos a la fracción S1 de los animales de 6 meses a 3 incubaciones secuenciales con 6E10. Estas incubaciones deberían inmunodepletar a

RESULTADOS

sAPP α de las fracciones S1 de los animales jóvenes PS1xAPP. Más concretamente, 100 μ g de proteína de la fracción S1 de PS1xAPP de 6 meses se sometieron a 3 inmuno-depleciones seriadas utilizando el anticuerpo 6E10. El extracto depletado, junto con la fracción S1 de PS1xAPP de 6 meses no depletada y la de WT de 6 meses, las empleamos para estimular la fosforilación en Ser-9 de GSK-3 β en cultivos de células N2a en medio de cultivo sin suero, usando los mismos controles internos mostrados en la figura R6.A. Los resultados obtenidos (ver figura R7.A) demuestran que la inmuno-depleción con 6E10 de la fracción S1 de los animales PS1xAPP de 6 meses revierte prácticamente en su totalidad la capacidad de inducir la fosforilación de GSK-3 β en Ser-9 (figura R7.C). Un efecto similar se observó sobre la fosforilación en Ser-473 y Thr-308 de AKT.

Aunque el anticuerpo 6E10 puede reconocer varias formas derivadas del procesamiento de APP, de todas ellas solamente los péptidos sAPP α y A β pueden encontrarse en las fracciones S1 de los animales jóvenes PS1xAPP. En este sentido, se ha demostrado recientemente el efecto inductor del A β monomérico en la fosforilación de Ser-9 de GSK-3 β (Giuffrida et al., 2009), lo que sugiere que esta forma de A β podría inducir la fosforilación de GSK-3 β en los animales jóvenes PS1xAPP. Sin embargo, no hemos conseguido detectar A β monomérico en las fracciones S1 de los animales PS1xAPP (ver figura R2), aun utilizando tiempos largos de exposición, o tras inmunoprecipitación con el anticuerpo 6E10 (ver figura R3.B). Por tanto, a la luz de nuestros resultados podemos concluir que el péptido sAPP α presente en el extracto soluble de los animales PS1xAPP es el principal responsable de la inducción en la fosforilación de GSK-3 β en el residuo Ser-9. Estos resultados apoyan la hipótesis de que APP α soluble es un factor determinante en la inducción de la fosforilación que hemos observado en los animales jóvenes PS1xAPP con respecto a los animales WT, aunque no podemos descartar que otros factores como IGF-1 también puedan participar en este efecto tanto *in vivo* como *in vitro*.

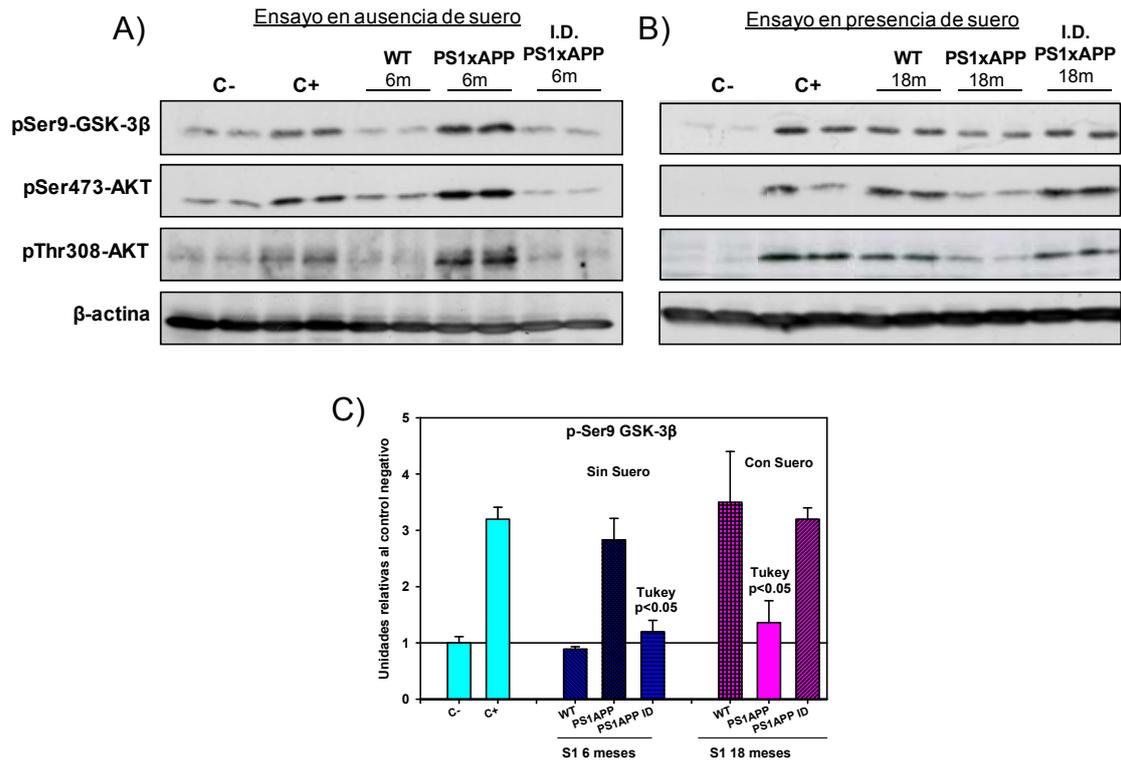


Figura R7. Efecto de las fracciones S1 de animales PS1xAPP inmunodepletadas con 6E10 o A11 sobre la fosforilación de GSK-3β en cultivos de N2a. A y B) WB representativo de la fosforilación de GSK-3β y AKT. Los cultivos se estimularon en un medio sin suero con S1 de animales WT y PS1xAPP de 6 meses, y éste último depletado con el anticuerpo 6E10 (A). O bien, en un medio con suero, con S1 de WT y PS1xAPP de 18 meses, y éste mismo depletado con el anticuerpo A11 (B). C+ y C- son los mismos mostrados en la figura R6. C) Representación cuantitativa de los resultados obtenidos en la fosfo-Ser9-GSK-3β con respecto al control negativo en A y B. La inmunodepleción de APPα soluble con el anticuerpo 6E10 revierte la fosforilación inducida en GSK-3β por la fracción S1 de PS1xAPP de 6 meses. Del mismo modo, la inmunodepleción de formas oligoméricas de Aβ con A11 de la fracción S1 de PS1xAPP de 18 meses abolió el efecto inhibitorio del extracto soluble sobre la fosforilación de GSK-3β. Los datos representados corresponden al promedio de 3 experimentos diferentes. Tukey p<0.05, cambios estadísticamente significativos con respecto a WT de 6 meses en A, o a WT de 18 meses en (B).

Por otra parte, también sospechamos que los oligómeros de Aβ solubles presentes en nuestros animales PS1xAPP de 18 meses (ver figura R4.A) podrían estar bloqueando la vía pro-supervivencia PI3K-AKT-GSK, llevando finalmente a la inhibición de la fosforilación en Ser-9 de GSK-3β. Este efecto podría explicar los resultados previamente encontrados *in vivo* e *in vitro*. Para comprobar este efecto, realizamos 3 inmunodeplecciones seriadas con el anticuerpo A11 sobre 100 µg de proteínas solubles de la fracción S1 de animales PS1xAPP de 18 meses en las que previamente habíamos comprobado la presencia de oligómeros de Aβ mediante WB. Con el extracto de proteínas depletado de formas oligoméricas de Aβ realizamos un ensayo de estimulación sobre células N2a en un medio con suero, incluyendo la estimulación con la fracción S1 de PS1xAPP de 18 meses no depletada, la de WT de 18 meses y los mismos controles internos que se muestran en la figura R6.B. Los

RESULTADOS

resultados mostrados en la figura R7.B, y de forma cuantitativa en R7.C, demuestran que la depleción con el anticuerpo A11 revierte en su totalidad el efecto inhibitor que muestra la fracción soluble de los animales PS1xAPP de 18 meses, no solo sobre la Ser-9 de GSK-3 β , sino también sobre los residuos Thr-308 y Ser-473 de AKT, lo que implica la reversión del efecto inhibitor sobre la vía completa PI3K-AKT-GSK-3 β . Estos resultados sugieren que la activación de GSK-3 β observada en el hipocampo de los animales PS1xAPP de 18 meses, podría estar mediada por el aumento en la concentración de las formas oligoméricas del péptido β -amiloide encontrada en estos animales.

3. Estudio de la proteína precursora del β -amiloide (APP) durante el proceso de envejecimiento en el cerebro de los animales PS1xAPP.

En esta sección nos apartamos del estudio de los mecanismos moleculares implicados en la neurotoxicidad ejercida por las formas de A β extracelulares solubles para profundizar en las razones que pueden dar lugar al aumento que se produce en estas especies durante el proceso de envejecimiento en los animales PS1xAPP. Puesto que la acción tóxica de las especies oligoméricas solubles ha sido ampliamente demostrada, conocer los factores dependientes de la edad implicados en este aumento podría constituir una diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad en el futuro.

3.1 Expresión y procesamiento de la proteína precursora del β -amiloide (APP) en los animales PS1xAPP durante el envejecimiento.

Nuestra hipótesis de partida supone que un aumento en la presencia de Abeta oligomérico extracelular podría estar motivado por cambios en la expresión y/o el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) durante el envejecimiento de nuestro modelo transgénico. Para corroborar nuestra hipótesis, abordamos el estudio de la expresión de APP en nuestro modelo PS1_{M146L}XAPP_{751-SL}. En primer lugar, analizamos la expresión por PCR a tiempo real de la proteína APP endógena murina, así como del transgén APP humano que porta las mutaciones *Swedish* y *London*, y se expresa bajo el dominio del promotor Thy-1 (propio exclusivamente de neuronas). En el caso del endógeno, hemos empleado una sonda *Taqman* prediseñada (*Applied Biosystems*) que reconoce el APP murino, mientras que para la medida del transgénico, usamos el fluoróforo *Sybrgreen* junto con cebadores específicos diseñados en las regiones donde la secuencia de mRNA humana y murina

son diferentes. En los experimentos de PCR para APP humano se incluye rutinariamente un control negativo (muestra *wild-type*) para comprobar que no existe amplificación de la forma endógena.

Para el desarrollo de estos experimentos, hemos empleado muestras de cDNA, obtenidas a partir de hipocampos de animales PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses, utilizando 10 animales de cada edad. Todos los cambios se han representado con respecto a la expresión basal de APP endógeno en animales PS1xAPP de 6 meses. Como se muestra en la figura R8, la expresión de la proteína APP transgénica es aproximadamente de 8 a 10 veces superior a la de la endógena, siendo por lo tanto la forma predominante en nuestro modelo. Como era de esperar, el análisis cuantitativo de la expresión de APP transgénica muestra gran variabilidad inter-individual entre los distintos animales estudiados, a diferencia de la expresión de la forma endógena, que se ha mostrado muy homogénea. Al comparar la media de expresión entre las distintas edades estudiadas pudimos concluir que no existen cambios estadísticamente significativos en la expresión de la forma transgénica durante el envejecimiento de los animales. Por el contrario, la forma endógena, siendo minoritaria muestra un incremento significativo en los animales de 18 meses con respecto a los animales de 6 meses PS1xAPP (figura R8).

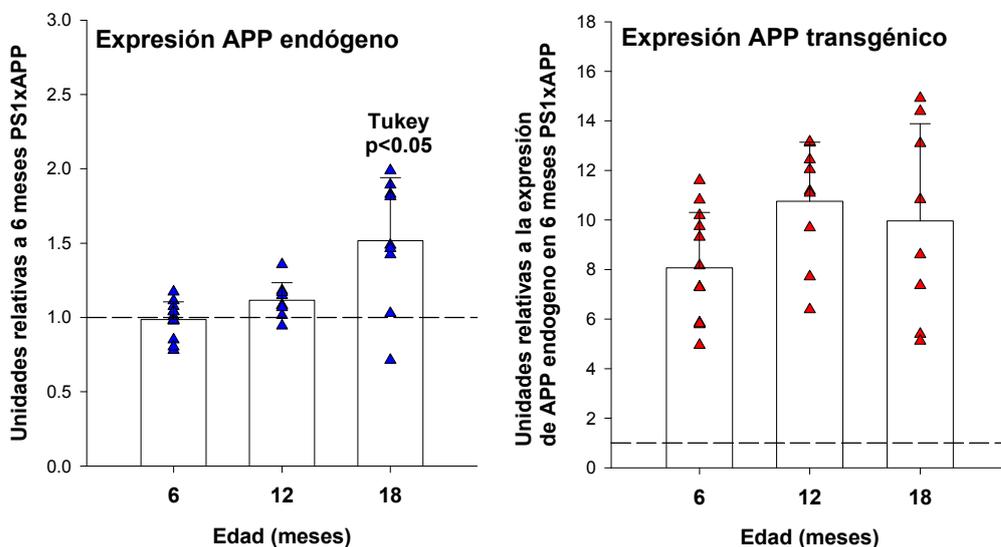


Figura R8. Expresión de mRNA de APP endógena y transgénica en el hipocampo de animales PS1xAPP. La dispersión de puntos representa los datos obtenidos de cada uno de los animales estudiados en cada grupo de edad (10-12 animales), mientras el gráfico de barras representa la media del grupo. Los datos obtenidos muestran que la expresión del transgén APP humano es muy superior a la del murino, y muy heterogénea, mientras la expresión de la forma endógena es muy homogénea. Cada ensayo se ha repetido 3 veces con los mismos animales. Tukey $p < 0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

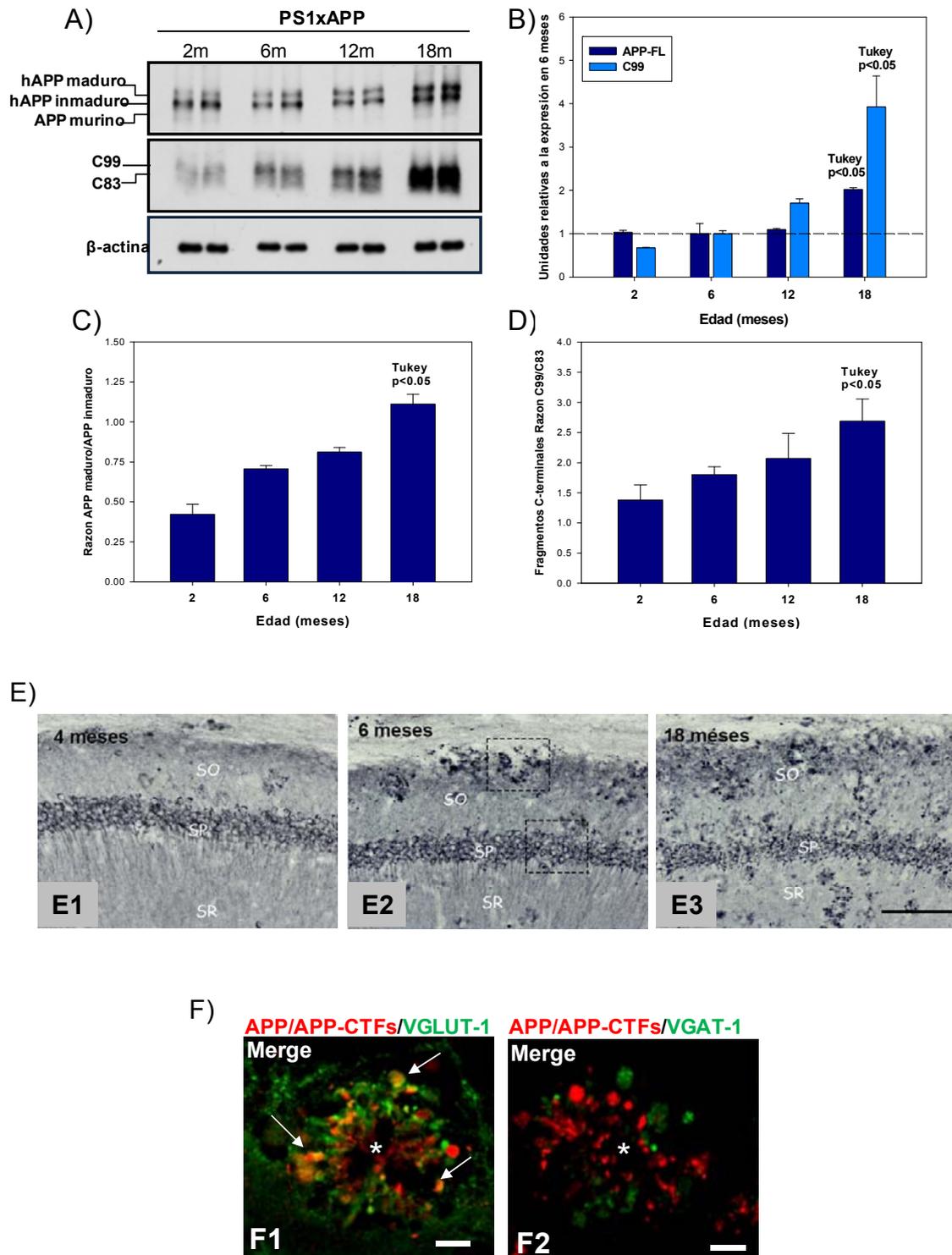
RESULTADOS

En segundo lugar, estudiamos mediante WB la presencia de la proteína APP en extractos de proteínas totales de hipocampo de animales PS1xAPP de 2, 6, 12 y 18 meses. El anticuerpo de elección (anti-APP-CTFs) reconoce la región C-terminal que va del aminoácido 676 al 695, idéntica en la proteína humana (hAPP), murina (mAPP), así como en las isoformas APP₆₉₅, APP₇₅₁ y APP₇₇₀. Por lo tanto, nuestro anticuerpo reconoce la forma de APP no procesada (APP-FL: *full-length*), los fragmentos transmembrana C99 y C83, y el péptido AICD, derivados del procesamiento de APP.

Al analizar la forma no procesada de la proteína APP hemos observado 2 bandas predominantes de aproximadamente 120KDa, que corresponden a las formas madura e inmadura (glicosilada y no glicosilada respectivamente) de APP transgénica (APP₇₅₁), mientras que la forma endógena puede observarse como una banda minoritaria de aproximadamente 100KDa (APP₆₉₅) (ver figura R9.A). Del análisis cuantitativo podemos concluir que tiene lugar un incremento estadísticamente significativo de la proteína APP humana en el hipocampo de los animales PS1xAPP de 18 meses (2.01 ± 0.04 ; $n=4$) con respecto a los de 6 meses (figura R9.B). En este sentido, también hemos detectado un aumento significativo en la razón de las formas madura e inmadura de la proteína APP humana durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP (figura R9.C). Por lo tanto, estos resultados reflejan una acumulación moderada de la proteína APP humana durante el envejecimiento, especialmente de la forma madura, lo que podría implicar un aumento en el procesamiento de APP ligado a la edad de los animales PS1xAPP.

Referente a los fragmentos C-terminales generados a partir de APP, en las muestras de animales PS1xAPP observamos consistentemente 2 bandas con un peso molecular de 14 y 12 KDa respectivamente (ver figura R9.A). El fragmento de 14 KDa es además reconocido por el anticuerpo 6E10 (Caballero et al., 2007), lo que demuestra que se trata del fragmento C99 procedente del procesamiento β -secretasa. Por el contrario, el fragmento de 12 KDa parece corresponder a C83, procedente del procesamiento α -secretasa. La cuantificación del fragmento C99 muestra un aumento estadísticamente significativo (3.92 ± 0.71 ; $n=4$) en los animales PS1xAPP de 18 meses (figura R9.B) con respecto a los de 6 meses. Por otra parte, al calcular la razón C99/C83 observamos que, a cualquier edad, C99 predomina sobre C83, lo que parece lógico ya que la forma de APP sobre-expresada en nuestros animales porta la mutación *Swedish*, lo que determina que APP se procese predominantemente por la vía amiloidogénica (Citron et al., 1992). Además, la razón C99/C83 aumenta de forma

progresiva y significativa entre 6 y 18 meses, indicando que el procesamiento de APP por ruta amiloidogénica esta favorecido respecto al no amiloidogénico durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP (figura R9.D).



RESULTADOS

Figura R9. Estudio de la proteína APP y fragmentos C-terminales en el hipocampo de animales PS1xAPP.
A) WB representativos para APP y APP-CTFs (C99 y C83) en animales de 2, 6, 12 y 18 meses. B) Representación cuantitativa de A. APP y C99 se acumulan durante el envejecimiento. C) Incremento en la razón APP humana madura/inmadura durante el envejecimiento. D) Evolución de la razón C99/C83 entre 2 y 18 meses. E) Inmunohistoquímica en la región CA1 del hipocampo en animales PS1xAPP usando el anticuerpo contra APP/APP-CTFs. Estos precursores de A β se acumulan con la edad en neuritas distróficas en torno a placas de A β del stratum oriens. La tinción también se observa en el estrato piramidal pero sin cambios significativos durante el envejecimiento. F) Microscopia confocal en animales de 6 meses. Sólo las distrofias de las neuronas glutamatergicas (VGLUT-1 positivas), y no de las GABAérgicas (VGAT positivas) presentan acumulación de APP/APP-CTFs. sp: stratum pyramidale; so: stratum oriens; sr: stratum radiatum. Escala mostrada: 100 μ m en E, y 15 μ m en F. Tukey $p < 0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses..

En este sentido, nuestro modelo presenta depósitos extracelulares de β -amiloide en el hipocampo desde edades muy tempranas (3-4 meses), aumentando progresivamente en tamaño y número con la edad de los animales. En paralelo a estos depósitos, aparecen también neuritas distróficas bordeando las placas de A β (Blanchard et al., 2003; Baglietto-Vargas et al., 2010). Ensayos de inmunohistoquímica desarrollados por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez (Universidad de Málaga) demostraron que la acumulación dependiente de la edad de APP/APP-CTFs en el hipocampo ocurre preferentemente en estas neuritas distróficas en torno a placas de A β (comparar figuras R9.E1, E2 y E3). Estos resultados también muestran un marcaje específico en los cuerpos neuronales del estrato piramidal (ver figura R9.E1), que no cambia con la edad del animal. Por otra parte, experimentos adicionales de inmunocolocalización fluorescente entre APP/APP-CTFs y VGAT/VGLUT-1 (transportadores vesiculares de GABA y glutamato respectivamente) mostraron que las neuritas distróficas inmunopositivas para los precursores de A β son de origen glutamatérgico y no GABAérgico (ver figuras R9.F1 y F2), lo que concuerda con la sobre-expresión de la proteína APP transgénica bajo dominio del promotor Thy-1 en las neuronas principales hipocampales.

Finalmente, cabe destacarse que el producto C-terminal AICD (*APP intracelular domain*) procedente del procesamiento γ -secretasa no se observó en nuestros extractos de proteínas totales, lo que sugiere que la degradación de este péptido podría ocurrir rápidamente en el citosol.

3.2 Estudio de la actividad secretasa implicada en la producción del β -amiloide.

3.2.1 Las actividades β - y γ -secretasa están aumentadas en los animales viejos PS1xAPP.

Los cambios observados en la expresión y el procesamiento de la proteína APP, junto con el incremento en la concentración de $A\beta$ soluble durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP, sugieren un posible aumento en la actividad de las enzimas secretasas implicadas en la producción del péptido β -amiloide.

En este sentido, el cálculo de la razón de los fragmentos C-terminales con respecto al sustrato de la enzima (APP) nos permite obtener una lectura indirecta del comportamiento de la actividad secretasa independiente de la concentración inicial del sustrato. Por lo tanto, el cálculo de la razón C99/hAPP o C83/hAPP nos permite estimar, no sin limitaciones, cómo cambia la actividad β - y α -secretasa respectivamente durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. Tras calcular esta razón hemos normalizado los resultados con respecto al valor obtenido en los animales PS1xAPP de 6 meses, al que hemos asignado arbitrariamente el valor unidad. Como se observa en la figura R10, existe un aumento significativo en la razón C99/hAPP, pero no en la razón C83/hAPP, asociada a la edad de los animales. Aunque este resultado sugiere un aumento en la actividad β -secretasa independientemente de la concentración del sustrato en los animales PS1xAPP de 18 meses, una estimación de este tipo probablemente no sea correcta en un sistema vivo como el nuestro, en el que el sustrato puede encontrarse en compartimentos celulares donde no tiene lugar la actividad enzimática, o bien la degradación del producto enzimático puede verse alterada a lo largo de la vida del animal. Por lo tanto, decidimos abordar esta cuestión empleando ensayos de actividad enzimática partiendo de cortezas de animales PS1xAPP distintas edades, dada la necesidad de emplear una cantidad considerable de proteína de membrana, así como tejido fresco.

RESULTADOS

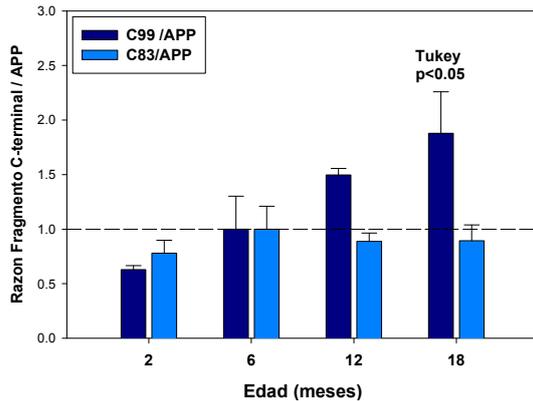


Figura R10. Relación fragmento C-terminal / APP en animales PS1xAPP durante el envejecimiento.

A partir de los resultados mostrados en la figura R2.A hemos estimado la razón C99/hAPP y C83/hAPP como lecturas indirectas para conocer cómo cambian la actividad β - y α -secretasa durante el envejecimiento en nuestro modelo PS1xAPP. Según estos resultados, la actividad β -secretasa debería estar aumentada en los animales viejos PS1xAPP durante el envejecimiento. Tukey $p < 0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

Para determinar la actividad β -secretasa en nuestro modelo, partimos de $50\mu\text{g}$ de proteína de membrana, solubilizadas en buffer de extracción (*R&D Systems*) o en CHAPS 1%-DOC 1%-SDS 2% en PBS. A este solubilizado añadimos una concentración saturante de sustrato que, una vez procesado, da lugar a un producto de reacción que emite fluorescencia a 495nm (ver materiales y métodos; apartado 15). Cuantificamos el incremento de fluorescencia por unidad de tiempo (1 hora) como medida de la actividad β -secretasa en animales PS1xAPP de 6 y 18 meses (figura R11). En este sentido, los animales PS1xAPP de 18 meses mostraron un incremento limitado pero significativo (1.60 ± 0.20 veces con respecto a 6 meses; $n=3$) en la actividad β -secretasa con respecto a los de 6 meses, obteniendo resultados similares con ambos medios de solubilización. Puesto que este ensayo de actividad está realizado a saturación y, por tanto, es independiente de la concentración del sustrato de partida, el aumento en la actividad β -secretasa que tiene lugar en los animales viejos debe estar motivado por un posible aumento en la cantidad de enzima (ver más adelante).

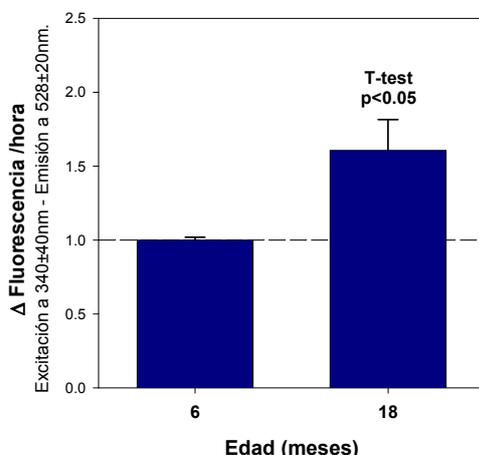


Figura R11. Actividad β -secretasa en la corteza de animales PS1xAPP. Para estos ensayos, hemos empleado un sustrato que da lugar a un producto fluorescente. Nuestros resultados muestran un incremento de fluorescencia/hora en animales de 18 meses estadísticamente significativo con respecto a 6 meses. Tukey $p < 0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses..

Por otra parte, si bien un aumento en la actividad β -secretasa podría estar ligado a un incremento en la producción del péptido β -amiloide, también se hace necesario abordar ensayos de actividad enzimática γ -secretasa para constatar si existe un mayor procesamiento del sustrato C99 que da lugar a los péptidos A β y AICD, durante el proceso de envejecimiento de nuestro modelo.

Para determinar la actividad γ -secretasa en nuestros animales hemos optado por un ensayo sin incluir detergentes, con la finalidad de evitar en lo posible desnaturalización de este complejo formado por cuatro subunidades (De Strooper, 2003). En estos experimentos, las membranas de corteza, obtenidas tras homogenizar en un medio hipotónico, se incuban a 37°C durante 2 horas y posteriormente se analiza la producción de AICD mediante WB con respecto a la de un control donde la incubación tiene lugar en presencia del inhibidor específico de la γ -secretasa (L-685,458) (ver materiales y métodos; apartado 16). Para estos ensayos hemos empleado animales PS1xAPP (3 de 3 meses y 5 de 6, 12 y 18 meses). Los resultados obtenidos aparecen en las figuras R12.A, y R12.B y muestran un incremento estadísticamente significativo en la producción de AICD por unidad de tiempo en los animales de 18 meses con respecto a los de 6 meses.

Este ensayo tiene el inconveniente de que no podemos controlar la cantidad de sustrato inicial, por lo que no podemos saber si la enzima está funcionando a velocidad máxima. Por este motivo, optamos por representar para cada animal la actividad γ -secretasa (medida por la producción de AICD) frente a la cantidad de sustrato C99 endógeno, previamente determinada mediante WB (figura R12.C). Esta representación muestra una cinética de saturación en la producción de AICD ($r^2=0.75$; $P<0.0001$) asociada a la edad de los animales. Como puede observarse, en los animales de entre 3 y 12 meses la actividad γ -secretasa aumenta en función de la cantidad de sustrato endógeno C99. Sin embargo, en los animales de 18 meses, se observa un incremento en C99 en ausencia de cambios de actividad, lo que sugiere que la γ -secretasa podría estar funcionando bajo condiciones de saturación por el sustrato. Esta saturación en el procesamiento γ -secretasa podría explicar, o estar implicada, en la acumulación de C99 observada en los animales de 18 meses.

Los resultados obtenidos de los ensayos de actividad enzimática β y γ -secretasa demuestran que durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP tiene lugar una potenciación de la ruta amiloidogénica, probablemente junto con un

RESULTADOS

incremento en la producción del péptido β -amiloide. Este aumento podría ser un factor determinante en la formación de oligómeros de A β en los animales de mayor edad.

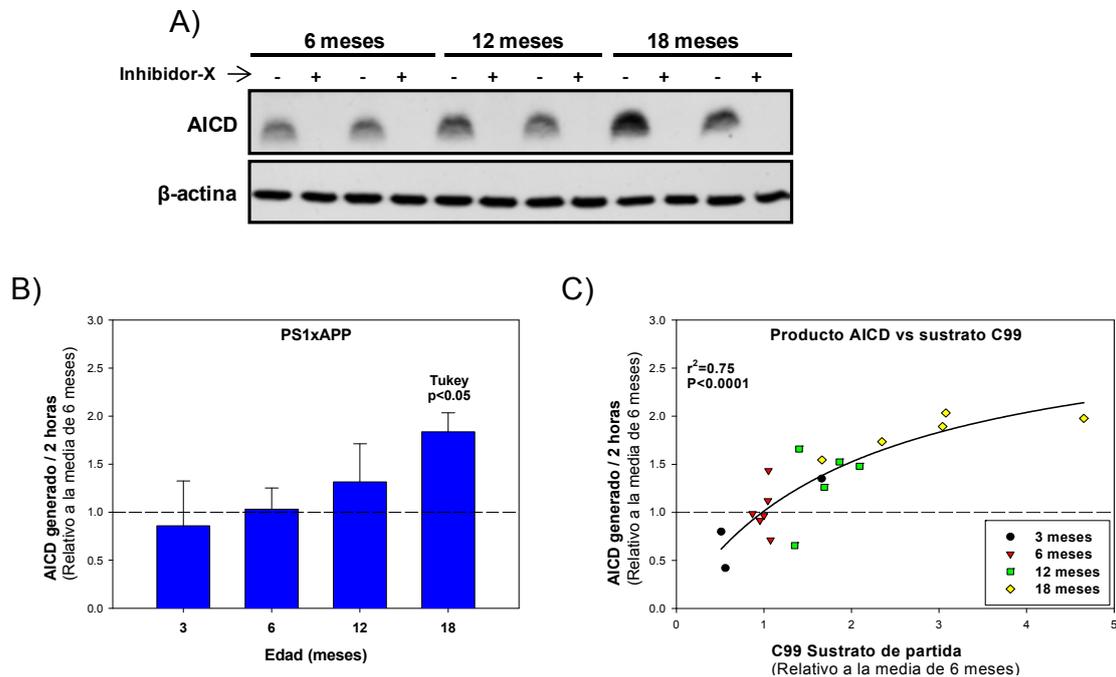


Figura R12. Actividad γ -secretasa en la corteza de animales PS1xAPP. A) WB representativo de la cantidad de AICD generada después de 2 horas de reacción. Las reacciones enzimáticas se duplicaron y una de ellas se incubó con el inhibidor L-685,458 (Inhibidor-X, 100 μ M). B) Representación cuantitativa de A. Los animales de 18 meses mostraron un incremento estadísticamente significativo en la producción de AICD con respecto a los de 6 meses. C) Cinética de saturación de la cantidad de AICD generada en función de la cantidad de partida de C99 para cada animal ensayado (todos los cambios están normalizados por la media de 6 meses tanto para C99 como para AICD). Cada ensayo se ha repetido al menos 2 veces. Tukey $p < 0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

3.2.2 La presencia de BACE-1 y PS1 está aumentada en los animales PS1xAPP durante el envejecimiento.

Para analizar más en profundidad los mecanismos implicados en el aumento en la actividad β y γ -secretasa, pasamos a estudiar la expresión de BACE-1 y PS1 en el hipocampo de nuestros animales. BACE-1 es la principal, si no la única enzima con actividad β -secretasa en el cerebro y se localiza únicamente en neuronas (Vassar et al., 2009). Por otra parte, los fragmentos C y N-terminal (CTF ó NTF) de PS1 forman parte del centro activo del complejo γ -secretasa (Laudon et al., 2004) y se generan mediante endoproteólisis de la forma completa durante la maduración del complejo (Thinakaran et al., 1996; De Strooper, 2003), por lo que el análisis de PS1-CTF representa una lectura indirecta del complejo γ -secretasa maduro. En este apartado estudiamos BACE-1 y PS1 tanto a nivel de expresión transcripcional como a nivel de

proteínas, para comprobar si sufren cambios en la expresión y/o el procesamiento que justifiquen el aumento de las actividades enzimáticas BACE-1 y γ -secretasa encontrado durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP.

Empezamos analizando la expresión génica de BACE-1 en muestras de cDNA de hipocampo de animales WT y PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses (n= 5-10), utilizando una sonda específica para la secuencia de mRNA maduro que codifica BACE-1 (*Applied Biosystems*). En la figura R13 se muestra la nube de puntos correspondiente a la totalidad de los animales analizados, así como el valor promedio del grupo. Los resultados obtenidos los normalizamos por la media obtenida en los animales WT de 6 meses, a la que asignamos el valor unidad. Nuestros resultados muestran un aumento moderado aunque estadísticamente significativo en animales de 18 meses con respecto a los de 6 meses, tanto en WT como PS1xAPP.

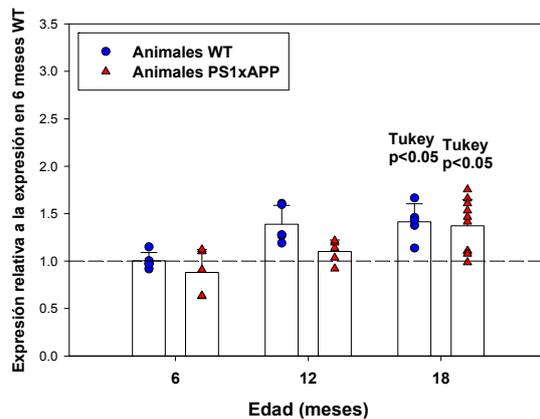


Figura R13. Expresión de mRNA de BACE-1 en el hipocampo de animales WT y PS1xAPP. La dispersión de puntos representa los datos obtenidos de cada uno de los animales estudiados en cada edad y genotipo (5 animales), mientras el gráfico de barras representa la media del grupo. Un incremento similar se observó tanto en animales WT como PS1xAPP en la expresión génica de BACE-1 durante el proceso de envejecimiento. Cada ensayo se ha repetido 3 veces con los mismos animales. (*): Tukey $p<0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

A continuación estudiamos mediante WB los niveles de BACE-1 en extractos de proteínas totales de hipocampo, usando en cada ensayo 3-5 animales de cada edad (6 y 18 meses) y tipo (WT y PS1xAPP) (ver figura R13.A). Hemos probado varios anticuerpos comerciales para detectar esta proteína con resultados poco satisfactorios. El anticuerpo finalmente elegido (Abcam) reconoce específicamente una banda difusa de aproximadamente 70 KDa, que corresponde a la forma madura de BACE-1 (glicosilada) y una doble banda en torno a 50 KDa, que parece corresponder a pro-BACE-1 (banda superior) y a la forma inmadura de BACE-1 (banda inferior) (ver figura R13.A). En este sentido, BACE-1 es liberada de su pro-dominio y glicosilada con carbohidratos complejos en el aparato de Golgi, lo que explicaría el aumento en el peso molecular y el aspecto de la banda correspondiente a la forma madura (Vassar et al., 2009).

RESULTADOS

Nuestros resultados de WB muestran un aumento de la forma inmadura de BACE-1 tanto en WT como en PS1xAPP de 18 meses con respecto a 6 meses (figura R14.B), muy similar al encontrado por PCR a tiempo real (figura R.13). Sin embargo en animales WT de 18 meses el incremento en la forma inmadura de BACE-1 no se reflejó en la forma madura, en la que solo apreciamos un leve aumento con respecto a los animales WT de 6 meses (1.14 ± 0.31 , $n=3$). Por el contrario, en los animales PS1xAPP de 18 meses, la forma madura de BACE-1 experimenta un incremento significativo con respecto a WT de 6 meses (2.20 ± 0.94 , $n=5$, ver figura R.14B), que no guarda relación con los cambios encontrados a nivel transcripcional y fue superior al que muestra la forma inmadura en estos mismos animales (ver figura R.14B), lo que posiblemente refleje deficiencias en la degradación de BACE-1 asociadas a la edad en los animales PS1xAPP.

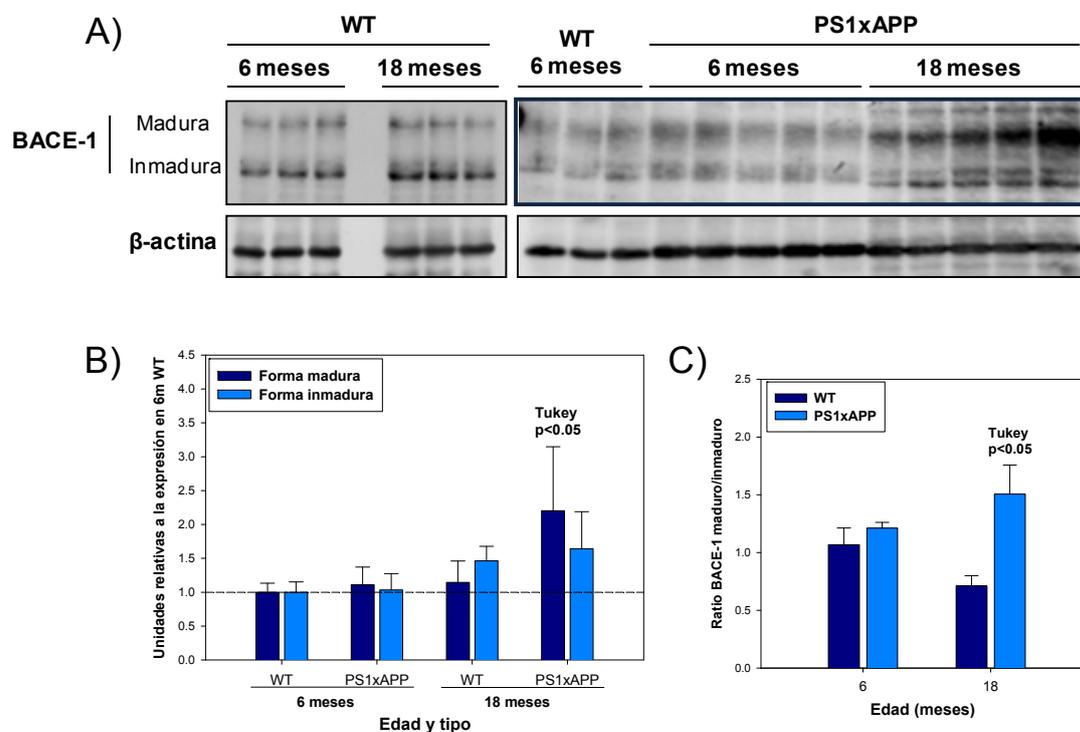


Figura R14. Estudio de BACE-1 mediante WB en el hipocampo de animales PS1xAPP y WT. A) WB representativo para BACE-1 en animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses ($n=3-5$). B) Representación cuantitativa de A. La forma madura experimentó un aumento significativo en los animales PS1xAPP de 18 meses con respecto a 6 meses. Todos los cambios observados tanto en la forma madura como la inmadura se han normalizado con el valor correspondiente obtenido en 6 meses WT. C) De acuerdo con estos resultados, el ratio BACE-1 maduro/inmaduro está incrementado en los animales viejos con respecto a los jóvenes mientras disminuye en los animales WT. Tukey $p < 0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

Finalmente, al representar la razón forma madura/inmadura de BACE-1, encontramos un incremento significativo en animales PS1xAPP, y un descenso en WT

(figura R14.C), lo que sugiere que el aumento de actividad β -secretasa asociada al envejecimiento en los animales PS1xAPP podría estar motivado por un aumento en la forma madura de BACE-1. Estos resultados están en concordancia con otros previamente descritos tanto en modelos, como en enfermos de AD (Zohar et al., 2005; Zhao et al., 2007; Tesco et al., 2007; Hebert S. et al., 2008; Sun et al., 2006).

En último lugar, abordamos el estudio de la expresión de PS1 del mismo modo que lo hicimos para BACE-1, tanto a nivel de expresión génica como proteica. Empezamos analizando a nivel transcripcional la expresión de PS1 endógena murina y transgénica humana. Esta última porta la mutación clínica M146L y se expresa bajo el control del promotor de la HMG-CoA reductasa. En estos ensayos hemos utilizado un total de 10 a 12 muestras de cDNA de hipocampo de animales PS1xAPP por grupo de edad, obviando en este caso a los animales WT. Para la cuantificación por PCR a tiempo real, hemos empleado una sonda específica para la forma murina, y cebadores junto con el fluoróforo *Sybrgreen* para la forma humana. Rutinariamente hemos incluido un control interno (un animal WT) en cada experimento de amplificación de la forma humana para corroborar que no existe especificidad contra la forma murina.

En la figura R15 se muestran los resultados individuales obtenidos de cada animal así como la media de cada grupo. Todos los resultados obtenidos se han normalizado con respecto a la media de expresión obtenida para la forma WT (mPS1) en los animales de 6 meses. Nuestros resultados muestran que la forma endógena presenta una expresión muy homogénea y un aumento significativo a los 18 meses. Contrariamente, y al igual que ocurría con el transgén de la APP, la expresión de la forma humana de PS1 es muy variable en función de los animales analizados. En este sentido, ya que nuestro análisis estadístico ha mostrado que los datos de la expresión de PS1 transgénica no siguen una distribución normal, hemos empleado el test de Kruskal-Wallis para la evaluación estadística de estos resultados. Tras este análisis, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de hPS1 entre los distintos grupos de edad estudiados.

RESULTADOS

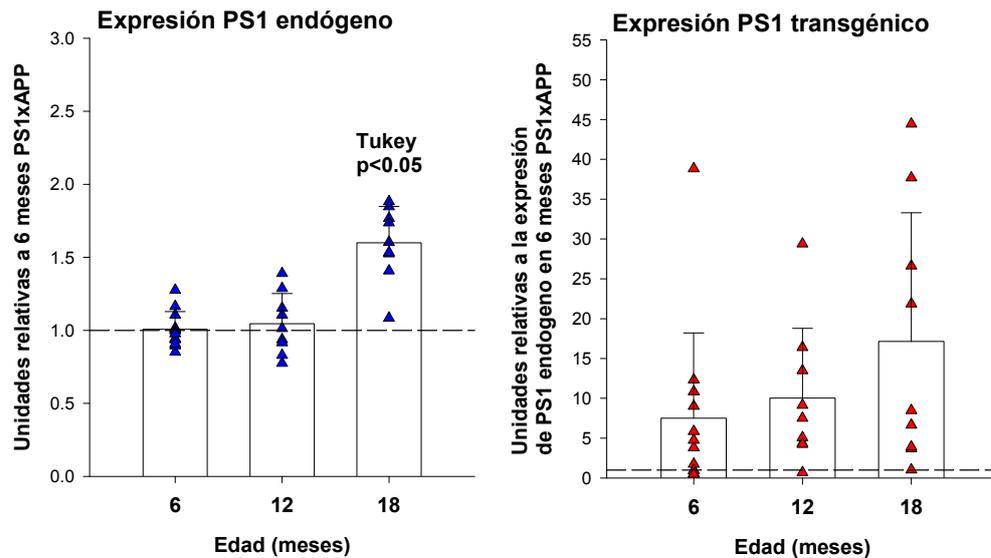


Figura R15. Expresión transcripcional de PS1 endógena y transgénica en el hipocampo de los animales PS1xAPP. La dispersión de puntos representa los datos obtenidos de cada uno de los animales estudiados en cada grupo de edad (10-12 animales), mientras el gráfico de barras representa la media del grupo. Los niveles de ARNm de PS1, tanto en la forma endógena como en la transgénica, están incrementados en los animales PS1xAPP de 18 meses con respecto a los de 6 meses. La expresión de la forma transgénica es muy heterogénea dentro del mismo grupo de edad y no siguen una distribución normal. Tukey $p<0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

Finalmente, abordamos mediante WB el estudio de PS1 en extractos de proteínas totales de hipocampo de animales PS1xAPP y WT de 6, 12 y 18 meses. El anticuerpo utilizado para WB reconoce la forma completa (PS1-FL) en torno a 55 KDa y el fragmento C-terminal (PS1-CTF), producto del procesamiento de la forma completa, incorporado en el complejo gamma-secretasa maduro. En los animales WT, el fragmento C-terminal murino se observa como una única banda en torno a 20KDa, mientras en los animales PS1xAPP aparece una segunda banda de movilidad electroforética ligeramente menor a la primera y que corresponde al fragmento C-terminal de la forma humana (ver figura R16.A) (Thinakaran et al., 1996).

En primer lugar, el estudio de los fragmentos C-terminales muestra un incremento estadísticamente significativo en los animales PS1xAPP tanto a 12 como a 18 meses con respecto a 6 meses (2.51 ± 0.69 y 2.69 ± 0.50 respectivamente; $n=4$). Aparentemente, este incremento en PS1-CTF total está motivado principalmente por el aumento que tiene lugar en el fragmento C-terminal de origen humano en 12 y 18 meses con respecto a 6 meses (3.08 ± 0.40 y 3.46 ± 0.47 respectivamente; $n=4$), y en menor medida por el que muestra de forma más moderada el fragmento endógeno (figuras R16.A y B). Por el contrario, en los animales WT no hemos encontrado ningún cambio significativo en la presencia del fragmento C-terminal durante el proceso de

envejecimiento (figura R16.C). Puesto que el fragmento C-terminal de PS1 se genera dentro del complejo γ -secretasa (Thinakaran et al., 1996; De Strooper, 2003), estos resultados sugieren que en los animales PS1xAPP viejos se produce una acumulación del complejo γ -secretasa, más que del fragmento C-terminal por sí mismo.

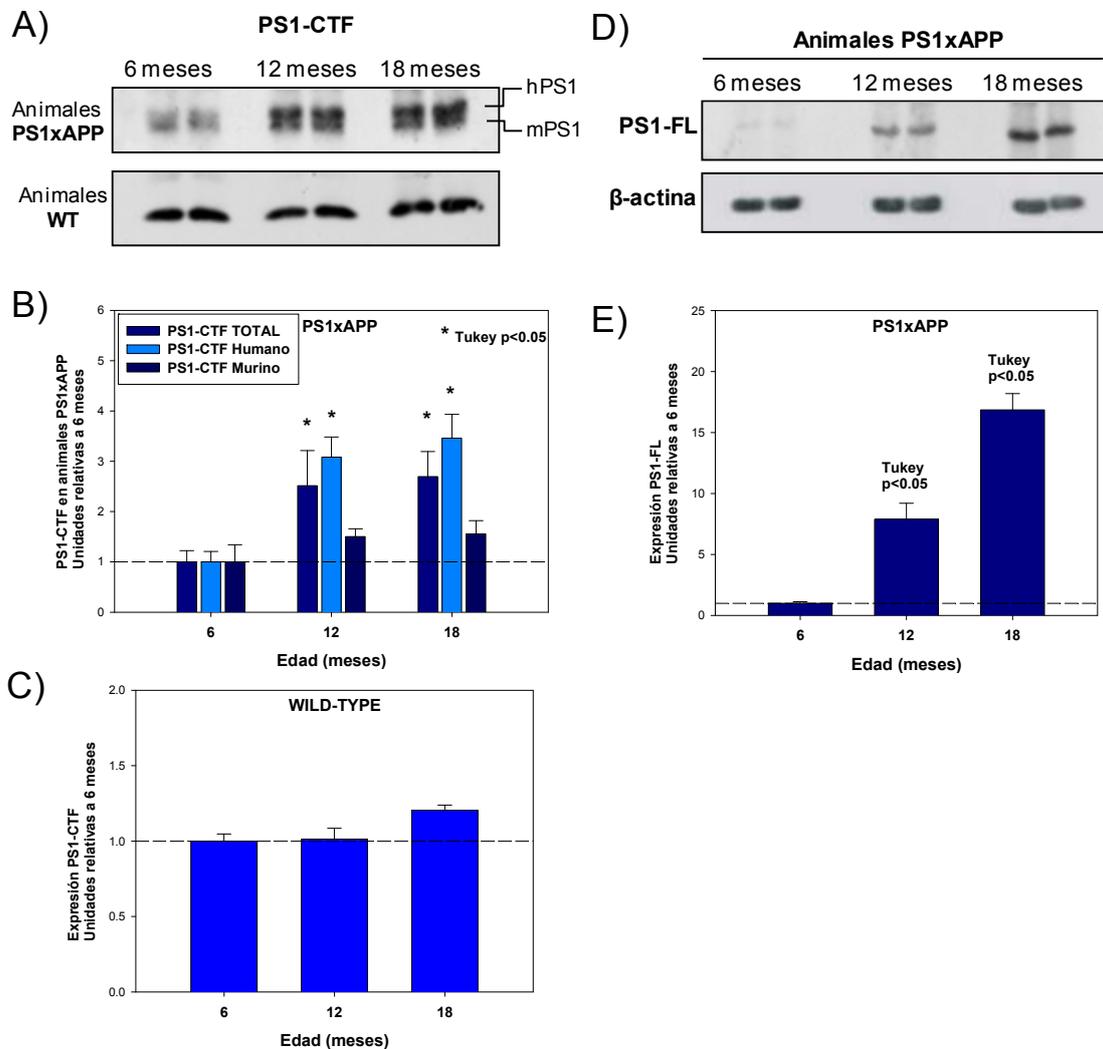


Figura R16. Estudio de PS1 y de los correspondientes fragmento C-terminales en el hipocampo de animales PS1xAPP. A y D) WB representativo de PS1-CTF y PS1-FL en animales de 6, 12 y 18 meses. Las muestras de cada edad y genotipo se presentan por duplicado. La forma no procesada PS1-FL no se observó en WT. B y C) Los fragmento C-terminales de PS1 experimentaron un aumento durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP (mas patente en el fragmento humano), pero no en WT. E) Acumulación de PS1-FL durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. Todos los cambios se presentaron normalizados con la media de 6 meses. (*): Tukey p<0.05, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

Por otra parte, nuestros resultados de WB también muestran una acumulación de FL-PS1 en el hipocampo de animales PS1xAPP durante el proceso de envejecimiento, que no se observó en animales WT, al no detectarse siquiera esta forma de PS1. El aumento de FL-PS1 se produce de forma lineal entre 6, 12 y 18

RESULTADOS

meses (figura R16.D), siendo estadísticamente significativo al comparar 6 y 12 meses, así como 12 y 18 meses (figura R16.E). Por tanto la PS1-FL acumulada en los animales viejos PS1xAPP probablemente corresponde en mayor medida a la forma transgénica humana. Teniendo en cuenta nuestros resultados previos a nivel transcripcional que no han mostrado diferencias significativas en la expresión de hPS1 entre las distintas edades estudiadas (figura R15), podemos deducir que la acumulación dependiente de la edad observada para PS1-CTF y PS1-FL debe estar motivada por deficiencias en la degradación asociadas al envejecimiento en los animales PS1xAPP.

Finalmente, aunque los resultados mostrados en este apartado se obtuvieron utilizando extractos de proteínas totales de hipocampo de animales WT y PS1xAPP, los mismos experimentos se han repetido en extractos de proteínas totales de corteza, obteniendo resultados muy similares a los aquí mostrados.

3.3 Implicación de los Rafts lipídicos o dominios de membrana resistentes a detergentes en la producción del péptido β -amiloide en los animales viejos PS1xAPP.

3.3.1 Análisis de los dominios de membrana resistentes a detergentes (DRMs) en gradientes de sacarosa en los animales PS1xAPP.

Aunque el aumento tanto en la cantidad de proteína BACE-1 y PS1 como en la actividad beta-secretasa y/o gamma-secretasa podrían explicar, al menos en parte, el aumento de las formas oligoméricas del A β , otros cambios también podrían estar implicados en este proceso. En este sentido, los resultados descritos en los últimos años relacionan la producción de β -amiloide con los niveles de colesterol (Grimm et al., 2008; Puglielli et al., 2001; Cramer et al., 2006) y con la formación de rafts lipídicos (revisión en Simons and Toomre, 2000; Cordy et al., 2006). Por este motivo, en primer lugar, determinamos la concentración de colesterol total en los extractos de membranas lipídicas de corteza de animales WT y PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses, usando un pool de membranas de 3 animales de cada edad y tipo. Nuestros resultados indican que no existen cambios significativos en la concentración de colesterol de membrana entre animales WT y PS1xAPP, ni en función de la edad de los animales (figura R17). Para confirmar este resultado, hemos determinado la concentración de colesterol total presente en las membranas de estos animales tras aplicar un paso previo de extracción de lípidos en una solución de cloroformo:metanol

(ver materiales y métodos; apartado 14). Aun así, hemos detectado niveles similares de colesterol en todos los animales estudiados.

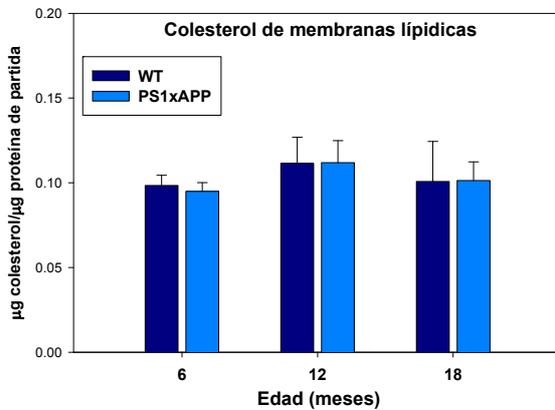


Figura R17. Determinación del colesterol total en membranas de corteza de animales WT y PS1xAPP. No se han encontrado cambios estadísticamente significativos asociados a la edad o el genotipo de los animales estudiados (n=3)..

A pesar de la ausencia de cambios significativos en los niveles de colesterol durante el envejecimiento, no podemos descartar que el colesterol pueda estar implicado en un aumento en la producción de β -amiloide durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. En este sentido, se han descrito los dominios de membrana tipo "raft" o DRM (membranas resistentes a detergentes) como regiones de membrana donde se localiza la actividad secretasa implicada en la producción de $A\beta$ (Cordy et al., 2003; Eehalt et al., 2003; Hur JY et al., 2008; Vetrivel et al., 2004). Para comprobar si estas regiones de membrana juegan un papel en la producción de β -amiloide durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP, hemos estudiado la acumulación de APP y C99 en estos dominios. Partimos de un pool de 3 animales PS1xAPP de cada edad para obtener un solubilizado de membranas con CHAPS 2%, que posteriormente fraccionamos en gradiente de sacarosa (ver materiales y métodos; apartado 8). Cada una de las fracciones del gradiente se analiza posteriormente mediante WB para caveolina-2, flotilina-1, APP-FL y APP-CTFs.

Caveolina-2 y flotilina-1 son dos proteínas de membrana empleadas habitualmente para identificar los dominios DRM, por lo que fueron los primeros estudiados tras el fraccionamiento en gradientes de sacarosa. Nuestros resultados muestran que ambos marcadores se localizan en las fracciones ligeras del gradiente (fracciones del 1 al 4) y muestran una distribución muy similar en los gradientes preparados a partir de membranas de animales de 6 y 18 meses, lo que demuestra que la distribución de estos marcadores es independiente de la edad de los animales estudiados (ver figura R18.A y B).

RESULTADOS

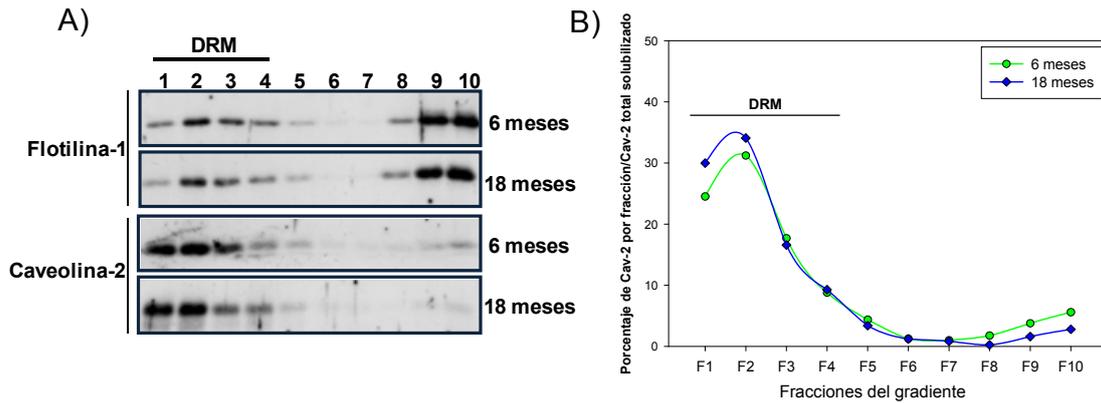


Figura R18. Estudio de flotilina-1 y caveolina-2 en los dominios de membrana resistentes a la solubilización por detergentes (Rafts lipídicos) en animales PS1xAPP. A) WB representativo de la distribución de flotilina-1 y caveolina-2 tras fraccionar las proteínas solubilizadas por CHAPS al 2% en gradiente de sacarosa. La fracción 1 corresponde a la región más ligera, y la 10 a la más pesada del gradiente. Las fracciones del 1 al 4 las hemos considerado como DRM. B) La distribución de caveolina-2 dentro del gradiente es muy similar entre 6 y 18 meses.

Tras comprobar la distribución de los marcadores de rafts lipídicos, pasamos a estudiar la acumulación de APP-FL y APP-CTFs en las fracciones de los gradientes de los animales PS1xAPP. Como se muestra en la figura R19.A y de forma cuantitativa en R19.B, la forma completa de APP apenas se presenta en las fracciones menos densas del gradiente, localizándose principalmente en las fracciones de mayor densidad. Además, al comparar los gradientes de los animales de 6 y 18 meses, no se han observado cambios en la distribución de APP entre fracciones ligeras y densas.

El estudio de los APP-CTFs en las fracciones de los gradientes de los animales de 6, 12 y 18 meses se muestra en la figura R19.C y de forma cuantitativa en R19.D. Al igual que ocurre con APP-FL, los APP-CTFs se localizan preferentemente en las fracciones más densas del gradiente de sacarosa. Nuestros resultados muestran un cambio en la distribución de APP-CTFs asociado a la edad (figura R19.C), que no se corresponde con la acumulación de C99 encontrada en los extractos de proteínas totales de los animales de 18 meses (ver figura R9). Por otro lado, al comparar los gradientes obtenidos en 6, 12 y 18 meses entre sí (figura R19.C), no encontramos diferencias aparentes en la cantidad de C99 total solubilizada y fraccionada. Es destacable la baja proporción de fragmentos CTFs solubilizados con CHAPS. De hecho, la mayoría de C99 aparece en los precipitados no solubilizados por CHAPS. En consecuencia, la acumulación de C99, que tiene lugar en los animales PS1xAPP de 18 meses, no se encuentra en la fracción de proteínas solubilizada con CHAPS al 2% y, por lo tanto, no se fracciona en los gradientes. Para solventar este aparente

problema experimental, y con la finalidad de intentar fraccionar la mayor cantidad posible de APP y APP-CTFs en los gradientes, previo al fraccionamiento en gradiente de densidad empleamos condiciones de solubilización más agresivas (DOC, CHAPS, Triton X-100, SDS...). Sin embargo, al utilizar estos detergentes para la solubilización, se modificó totalmente la distribución de la flotilina-1 y la caveolina-2. De hecho, ambos marcadores de rafts aparecen en fracciones de alta densidad de los gradientes. Este cambio en la densidad de los supuesto rafts lipídicos podría ser explicada por un efecto de deslipidación debida a los detergentes. En consecuencia, la asociación proteína-lípido se pierde y con ella la capacidad para flotar de los marcadores flotilina-1 y caveolina-2 (ver materiales y métodos; apartado 8.4).

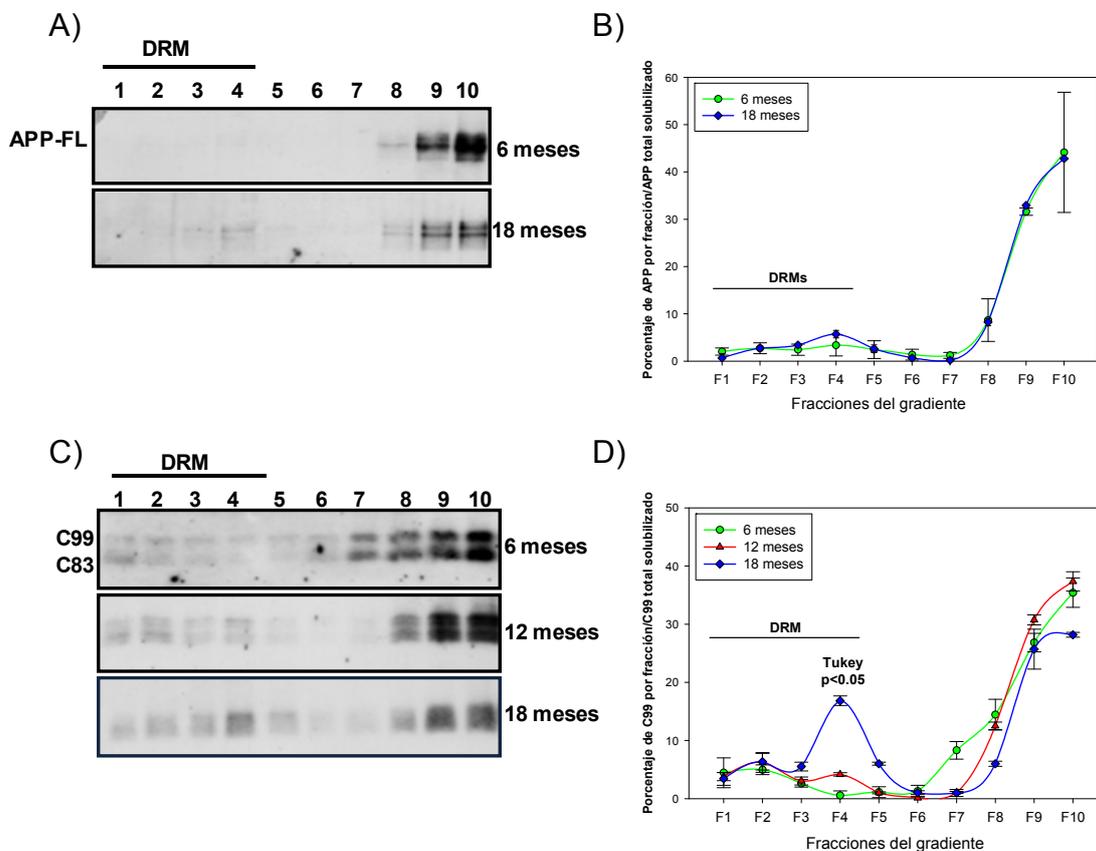


Figura R19. Estudio de APP-FL y APP-CTFs en los dominios de membrana resistentes a la solubilización por detergentes (Rafts lipídicos) en animales PS1xAPP. A y C) WB representativo de la distribución de APP-FL y APP-CTFs tras fraccionar las proteínas solubilizadas por CHAPS al 2% en gradiente de sacarosa. La fracción 1 corresponde a la región ligera, y la 10 a la más pesada del gradiente. Las fracciones del 1 al 4 las hemos considerado como DRM. B) La distribución de APP-FL dentro del gradiente es muy similar entre 6 y 18 meses. D) La distribución de C99 dentro del gradiente es muy semejante entre animales de 6, 12 o 18 meses. Se detectó un ligero incremento en la cantidad de C99 localizada en las fracciones DRM en los animales de 18 meses con respecto a 6 meses. Tukey $p<0.05$ denota cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos empleando esta metodología sugieren que la acumulación de los precursores del péptido β -amiloide que tiene lugar durante el proceso de envejecimiento de los animales PS1xAPP no se da en las regiones de membrana clásicamente definidas como DRM (*"Rafts lipídicos"*). Por tanto, tampoco cabe esperar que el aumento en la actividad secretasa asociado a la edad tenga lugar en estos dominios de membrana.

3.3.2 La solubilización de APP y C99 cambia durante el proceso de envejecimiento de los animales PS1xAPP.

Dada la incapacidad de fraccionar el contenido de APP y APP-CTFs presentes en los animales PS1xAPP en gradientes de sacarosa, decidimos abordar ensayos de solubilización empleando condiciones más extremas que nos permitiesen fraccionar todo el contenido de proteínas de membranas. Con esta finalidad realizamos experimentos de solubilización secuencial (ver materiales y métodos; apartado 7) que nos permiten obtener entre 3 y 4 solubilizados diferentes partiendo de la misma muestra de membranas. Para estos ensayos partimos de un pool de membranas de 3 animales PS1xAPP diferentes para cada edad (6, 12 y 18 meses). En primer lugar, obtenemos las proteínas de membrana solubilizadas en CHAPS 2% (1ª Solub.), en segundo lugar las solubilizadas en CHAPS 1%-DOC 1%-SDS 2% (2ª Solub.), en tercer lugar las solubilizadas en SDS 2% (3ª Solub.) y finalmente el remanente insoluble a todas las demás se solubiliza en SDS 4%-Urea 8M (4ª Solub.). De este modo obtenemos un gradiente en el que las proteínas más solubles se encuentran en el primer solubilizado, y las más resistentes en los últimos. A efectos prácticos, la mayoría de las proteínas de membrana se encuentran solubilizadas en las fracciones primera y segunda, mientras que en la tercera y la cuarta fracción encontramos mayoritariamente péptido β -amiloide procedente de las placas extracelulares que se caracterizan por ser especialmente insolubles (ver resultados en el apartado 5).

Como primera medida, analizamos la cantidad de colesterol aislada en cada fracción. Como era de esperar (Schuck et al., 2003), nuestros resultados muestran que la solubilización con CHAPS al 2% es capaz de extraer prácticamente el 100% del colesterol de las preparaciones de membranas de partida, siendo despreciable la concentración calculada para la 2ª solubilización o posteriores (figura R20). Más concretamente, la concentración de colesterol en la fracción solubilizada con CHAPS al 2% fue en torno a 0.12 mg de colesterol/mg de proteína de partida, similar a la obtenida previamente en membranas totales (figura R17).

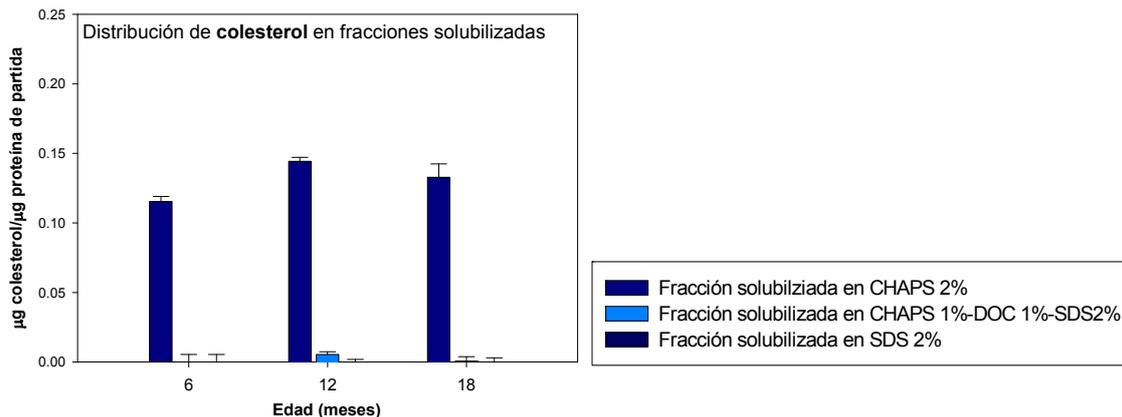


Figura R20. Distribución del colesterol total en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP. La mayor parte del colesterol se detecta en la primera fracción obtenida mediante solubilización con CHAPS, mientras en fracciones posteriores la concentración obtenida es despreciable. El valor obtenido en la primera fracción es muy semejante al calculado en un extracto de membranas totales en animales de 6, 12 y 18 meses.

En segundo lugar, analizamos mediante WB la distribución de APP y APP-CTFs, así como de los marcadores caveolina-2 y flotilina-1 (figura R21.A) en cada uno de los solubilizados procedentes de animales PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses. Los resultados obtenidos muestran un desplazamiento de APP y APP-CTFs a fracciones más insolubles, en concordancia con lo observado previamente en los gradientes de sacarosa. Tanto APP-FL como C99 se encuentran solubilizados solo parcialmente por CHAPS al 2%, mientras el resto permanece insoluble a éste detergente (figuras R21.B y C). La situación es especialmente importante en los animales viejos PS1xAPP, en los que la proporción de C99 acumulado en la fracción insoluble a CHAPS (2º Solub) es alrededor de 8 veces mayor que la observada en 6 meses (figura R21.C). Por otra parte, caveolina-2 y flotilina-1 tuvieron un comportamiento similar al descrito para APP-FL y APP-CTFs (ver figura R21.A). Ambos mostraron con la edad un fuerte incremento en la segunda fracción solubilizada y cierta tendencia a disminuir en la primera solubilización. Estos resultados ponen de manifiesto que solamente una parte de estos marcadores (la que se encuentra solubilizada por CHAPS) se estudia en gradientes de sacarosa según la metodología empleada en este trabajo.

En este sentido, la capacidad del detergente CHAPS para extraer el colesterol de las membranas lipídicas no parece mostrar relación con la proporción de APP-FL, C99, flotilina-1 y caveolina-2 que permanece insoluble a este detergente, especialmente en los animales viejos PS1xAPP (comparar figuras R20 y R21.A). Este

RESULTADOS

resultado pone de manifiesto los artefactos creados al incorporar detergentes en nuestras aproximaciones experimentales (Schuck et al., 2003).

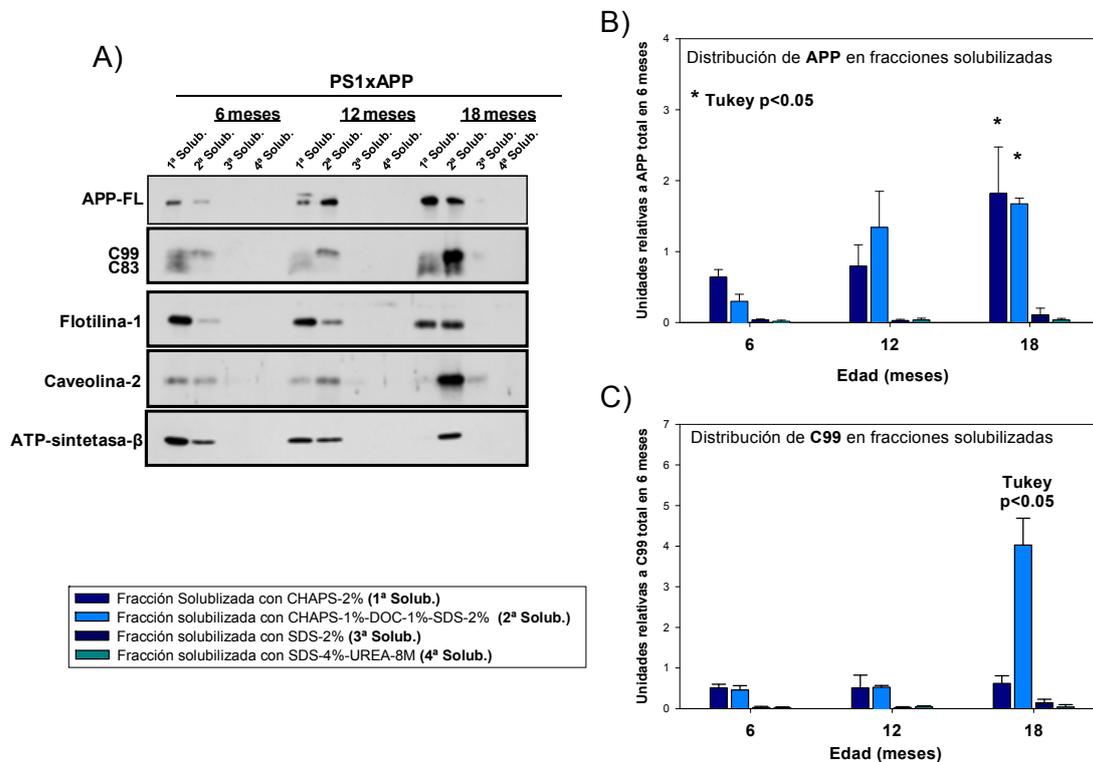


Figura R21. Estudio de los precursores del β -amiloide en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP. A) WB representativo para APP-FL, APP-CTFs, flotilina-1, caveolina-2 y ATP-sintetasa β en las fracciones de la solubilización secuencial de animales de 6, 12 y 18 meses. Todos estos marcadores se concentran en las dos primeras fracciones (1ª y 2ª Solub.), y su presencia resultó despreciable en las posteriores. B) La acumulación de APP-FL tiene lugar de forma similar tanto en la 1ª como en la 2ª Solub. durante el envejecimiento. C) La acumulación de C99 se produjo sobre todo en la 2ª Solub. en los animales viejos.. (*): Tukey $p < 0.05$ denota cambios estadísticamente significativos con respecto a la misma fracción 6 meses.

Junto a flotilina-1 y caveolina-2, también estudiamos la presencia del marcador mitocondrial ATP-sintetasa β . Esta proteína mostró un fuerte desplazamiento desde la primera hasta la segunda fracción solubilizada entre animales de 6 y 18 meses PS1xAPP. De hecho, en los animales viejos PS1xAPP, este marcador de mitocondrias se encuentra mayoritariamente en la fracción de proteínas resistentes a CHAPS. La presencia de mitocondrias en esta fracción podría ser indicativo de la acumulación de los precursores de A β en un compartimento celular o en cuerpos de inclusión de difícil acceso a detergentes (Kaganovich et al., 2008), más que en regiones específicas de membranas lipídicas. Teniendo en cuenta la fuerte acumulación de flotilina-1 y caveolina-2 en la misma fracción, probablemente ambas posibilidades no sean excluyentes entre sí.

Con la finalidad de conocer si este fenómeno es un efecto del proceso de envejecimiento normal, pasamos a estudiar flotilina-1, caveolina-2 y ATP-sintetasa β en membranas de animales WT solubilizadas de forma secuencial, del mismo modo que lo hicimos para los animales PS1xAPP. Igualmente empleamos para ello un pool de 3 animales por edad, aunque en este caso, solamente hemos realizado 3 solubilizaciones secuenciales, siendo la última de ellas en SDS al 2%. Como esperábamos, tanto flotilina, como caveolina, como la ATP-sintetasa fueron fácilmente solubilizadas por CHAPS al 2% (figura R22), y apenas se acumularon en la segunda solubilización (proteínas resistentes a CHAPS). Este resultado demuestra que la acumulación observada tanto de APP como de C99 en los animales viejos PS1xAPP debe ser reflejo del proceso de envejecimiento patológico asociado al modelo PS1xAPP.

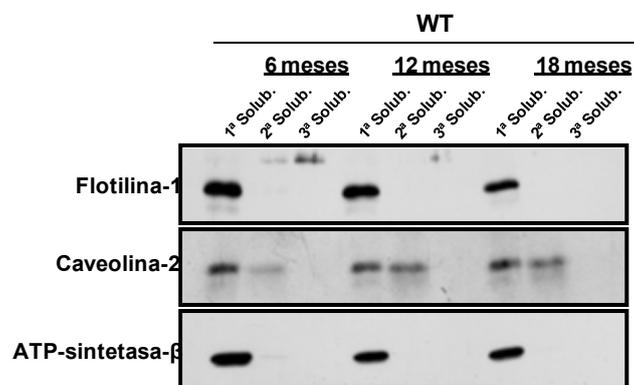


Figura R22. Estudio de los marcadores de Rafts lipídicos y ATP-sintetasa β en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP. Tanto flotilina-1, como caveolina-2, como ATP-sintetasa β se solubilizaron fácilmente por CHAPS y por consiguiente aparecieron en la primera fracción obtenida en todas las edades estudiadas. Este resultado es completamente opuesto al obtenido en PS1xAPP (figura R21).

Para intentar establecer una relación entre los resultados obtenidos en los experimentos de solubilización secuencial y la actividad secretasa implicada en el procesamiento de APP y C99, procedimos a estudiar BACE-1 y PS1 en los 3 primeros solubilizados obtenidos en los animales PS1xAPP de cada edad. Como se muestra en la figura R23.A, tanto la forma madura de BACE-1, como PS1-CTF, y PS1-FL se acumulan en la fracción de proteínas resistentes a CHAPS, y aumentan de forma significativa en los animales PS1xAPP de 18 meses, de manera similar a la descrita para los extractos de proteínas totales (ver figura R23.B, C y D). Este resultado pone de manifiesto que durante el proceso de envejecimiento de los animales PS1xAPP se acumulan en la fracción de proteínas de membranas resistentes a CHAPS tanto los

RESULTADOS

precursores del A β , como la maquinaria enzimática necesaria para que tenga lugar su producción.

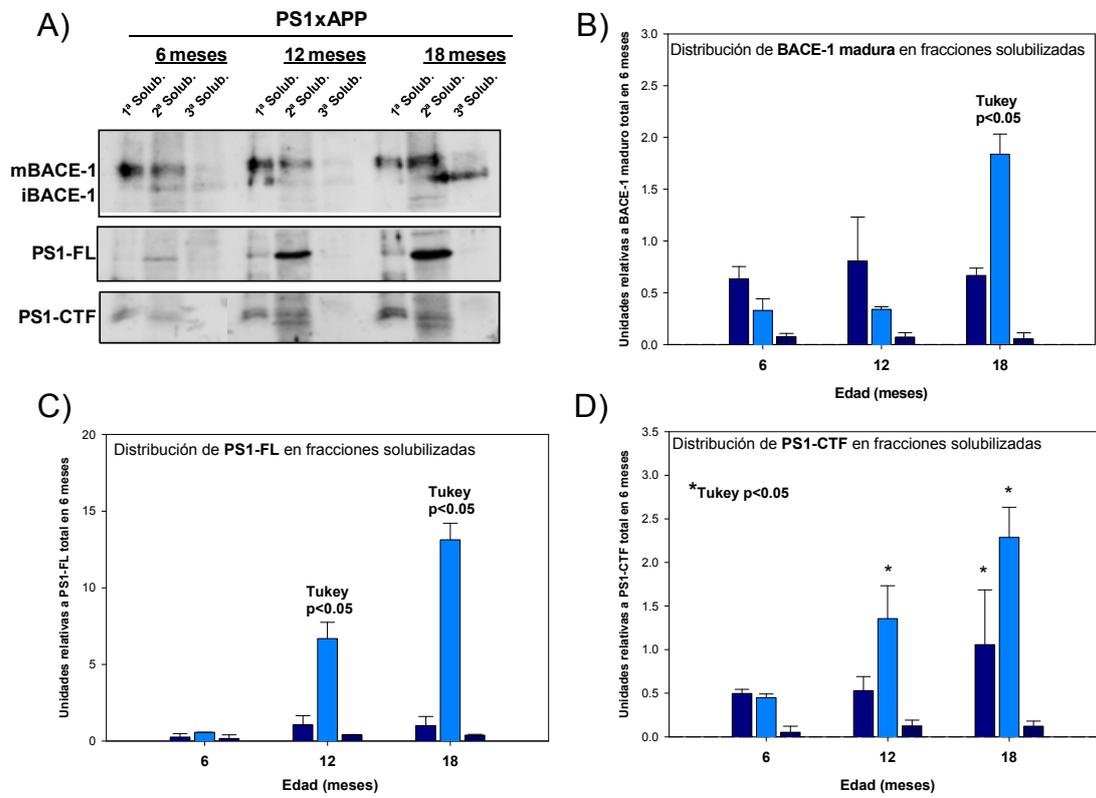


Figura R23. Estudio de BACE-1 y PS1 en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial en animales PS1xAPP. A) WB representativo para BACE-1, PS1-FL y PS1-CTF en las fracciones de la solubilización secuencial de animales de 6, 12 y 18 meses (n=3). En este caso, solo hemos mostrado hasta la 3ª Solub. porque estos marcadores se concentran en la 1ª y 2ª Solub. B) La acumulación de BACE-1 se produce principalmente en la 2ª Solub. durante el envejecimiento. C) La acumulación de PS1-FL y PS1-CTF se producen también preferentemente en la 2ª Solub. en los animales viejos. (*): Tukey p<0.05, cambios estadísticamente significativos con respecto a la misma fracción en 6 meses).

Según nuestra experiencia en gradientes de sacarosa la fracción de proteínas resistentes a CHAPS no parece corresponder a regiones de membrana resistentes a la solubilización por detergentes o DRM, pues no muestran capacidad para flotar en gradientes de densidad. En este sentido, y atendiendo al resultado obtenido para el marcador mitocondrial ATP-sintetasa- β , podemos pensar que esta fracción representa algún compartimento celular formado por otros compartimentos membranosos y agregados de proteínas con difícil acceso a los detergentes suaves como CHAPS.

4. Implicación de la ruta autofágica en la producción de A β durante el envejecimiento en los ratones PS1xAPP.

4.1 La razón BAG-3/BAG-1 está incrementada en los animales viejos PS1xAPP.

La autofagia es un proceso celular que se activa en las células durante situaciones de privación de energía o nutrientes (ver Kohli and Roth, 2010 para revisión). Este proceso también está implicado en la degradación de agregados de proteínas insolubles que aparecen normalmente asociados al envejecimiento normal y a las enfermedades neurodegenerativas (Ding WX et al., 2008; Gamerding et al., 2009). En este sentido, en el apartado anterior hemos descrito la acumulación de los precursores del β -amiloide (APP-FL y C99), así como de BACE-1 y PS1-CTF en una fracción de proteínas de membrana resistente a CHAPS durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. Además, en esta fracción relativamente resistente a detergentes, también se acumulan proteínas de origen intracelular muy distinto, como la ATP-sintetasa β . Esta acumulación de proteínas de origen diverso podría sugerir la posible implicación de autofagosomas.

Para esclarecer esta cuestión, en primer lugar estudiamos, mediante PCR a tiempo real, la expresión génica de BAG-3 y BAG-1. Estas dos proteínas se regulan de forma recíproca durante el proceso de envejecimiento: mientras BAG-1 está implicada en la degradación de proteínas ubiquitinadas a través del proteasoma, BAG-3 participa en la degradación por vía autofágica (Gamerding et al., 2009). En la figura R24 se muestra la expresión génica de BAG-3 normalizada por la de BAG-1 en hipocampo. Como esperábamos, nuestros resultados muestran un incremento en BAG-3 con respecto a BAG-1 tanto en WT como en PS1xAPP a los 18 meses. También encontramos un incremento en la expresión de BAG-3 relativa a BAG-1 en los animales PS1xAPP con respecto a los WT, tanto en 6 como en 18 meses. En definitiva, estos resultados sugieren que la degradación por vía autofágica debe estar favorecida en los animales PS1xAPP con respecto a WT. Además, esta vía estaría favorecida durante el proceso de envejecimiento en ambos genotipos.

RESULTADOS

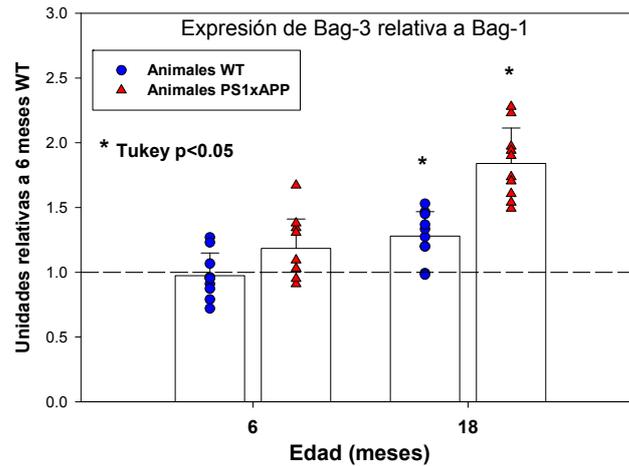


Figura R24. Expresión de mRNA de de BAG-3 con respecto a BAG-1 en el hipocampo de los animales WT y PS1xAPP. La dispersión de puntos representa los datos obtenidos de cada uno de los animales estudiados en cada grupo de edad (10 animales), mientras el gráfico de barras representa la media del grupo. La expresión de BAG-3 está incrementada de forma estadísticamente significativa en los animales PS1xAPP de 18 meses con respecto a WT de 6 meses. También se detecta un incremento más suave tanto en PS1xAPP de 6 meses como en WT de 18 meses. (*): Tukey $p < 0.05$ denota cambios estadísticamente significativos con respecto a WT de 6 meses.

En el caso de los animales PS1xAPP viejos, el aumento en la razón BAG-3/BAG-1 coincide con la aparición de una fracción de proteínas de membrana relativamente resistente a la solubilización por detergentes. En este sentido, puesto que la acumulación de APP-FL, C99, BACE-1 y PS1 durante el envejecimiento tienen lugar en la misma fracción de proteínas resistentes a CHAPS, podríamos esperar que todas ellas, agregadas en vesículas, estén destinadas a la degradación por vía autofágica-lisosomal. De acuerdo con esta hipótesis, las vesículas autofágicas se han descrito como sitios celulares donde tiene lugar la producción del β -amiloide (Yu et al., 2004; Yu et al., 2005). Además, estos compartimentos muestran una doble membrana lipídica externa y habitualmente contienen numerosos cuerpos multivesiculares (Nixon et al., 2005), lo que podría explicar la resistencia de estas proteínas a la solubilización por detergentes suaves como CHAPS.

4.2 La presencia de la proteína LC3-II está incrementada en los animales viejos PS1xAPP.

La proteína asociada a microtúbulos LC3 (*light chain 3*) constituye el equivalente eucariota de Atg8. Existe una forma de LC3 que aparece conjugada con fosfatidil-etanolamina en la doble membrana de las vesículas autofágicas (AVs) y se denomina LC3-II. Esta forma lipidada de LC3 está en las vesículas autofágicas desde

que se inicia la formación de los autofagosomas hasta la fusión con los lisosomas, momento en el que se degrada por las enzimas lisosomales. Por tanto, la monitorización de esta proteína nos permite conocer como se modifica la autofagia en los animales PS1xAPP durante el proceso de envejecimiento (Nedelsky et al., 2008). Como siguiente paso, en este trabajo hemos estudiado mediante WB el marcador LC3-II en extractos de proteínas totales de hipocampo de animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses. El anticuerpo utilizado reconoce específicamente 2 bandas. La mayor de ellas, en torno a 16 KDa, corresponde a la forma soluble de LC3 (LC3-I) predominante cuando las muestras empleadas son proteínas totales. La segunda banda, con un peso de 12 KDa representa la forma lipidada de LC3 asociada a membranas (ver figura R25.A).

LC3-II fue difícil de detectar mediante WB en animales WT, en los que habitualmente hubo que emplear una carga importante de proteína y tiempo largos de exposición tanto en 6 como en 18 meses de edad. Por el contrario, en los animales PS1xAPP aparecen niveles superiores de este marcador con respecto a los WT (2.07 ± 0.15 a los 6 meses, $n=3$) (ver figuras R25.A y R25.B). En animales PS1xAPP de 18 meses, LC3-II aumentó en torno a 6 veces con respecto a WT de 6 meses, y en torno a 5 veces con respecto a PS1xAPP de 6 meses. Por lo tanto, estos resultados corroboran nuestra hipótesis e indican la posible acumulación de vesículas autofágicas asociada a la edad en los animales PS1xAPP.

En segundo lugar, estudiamos la presencia de LC3-II en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial de proteínas de membranas (apartado 3.3.2). En los animales WT comprobamos que este marcador se solubiliza fácilmente por CHAPS y aparece predominantemente en la 1ª fracción solubilizada a cualquier edad estudiada (figura R25.C; panel superior). El mismo análisis realizado en animales PS1xAPP mostró la acumulación, dependiente de la edad, de LC3-II en la fracción de proteínas resistentes a CHAPS (figura R25.C; panel inferior). Esta acumulación se observó ligeramente en los animales de 6 meses, y aumentó de forma lineal entre 12 y 18 meses, alcanzando niveles semejantes a los descritos previamente en los extractos de proteínas totales de hipocampo (figura R25.D). La fuerte acumulación de la proteína LC3-II en la fracción resistente a la solubilización por CHAPS sugiere que otras proteínas también acumuladas en esta fracción como APP-FL, C99, BACE-1 y PS1 podrían estar englobadas en vesículas autofágicas.

RESULTADOS

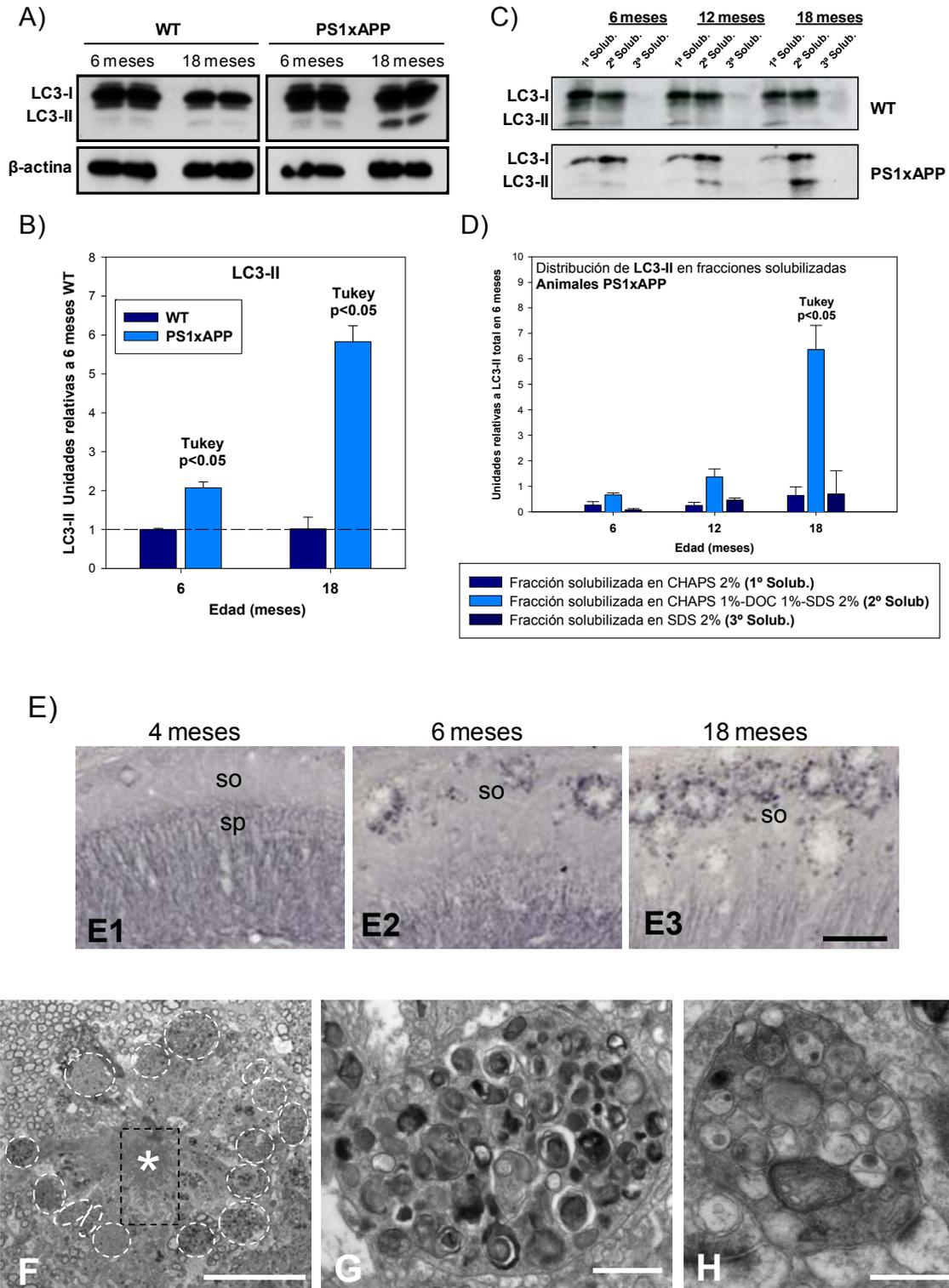


Figura R25. Estudio de la acumulación de vesículas autofágicas en el hipocampo de los animales PS1xAPP. A) WB representativo para LC3 en extractos de proteínas totales de animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses. B) El marcador de vesículas autofágicas LC3-II apenas se detecta en WT, mientras que se acumula en PS1xAPP, y durante el proceso de envejecimiento. C) WB representativo de LC3 en las muestras obtenidas mediante solubilización secuencial en WT o PS1xAPP. D) La acumulación de LC3-II asociada al envejecimiento de los animales PS1xAPP tiene lugar en una fracción relativamente resistente a la solubilización por CHAPS. E) Ensayos de inmunohistoquímica muestran tinción de LC3 en el cuerpo de las neuronas piramidales y en las distrofias en torno a placas de A β localizadas en el stratum oriens. La tinción en torno a placas es progresivamente mayor en función de la edad de los animales (E1-E3). F) Imágenes de microscopía electrónica muestran acumulación de vesículas que presentan morfología típica de vesículas autofágicas en neuritas distróficas en torno a las placas de A β (G) y en terminales pre-sinápticas atrofiadas. sp: stratum pyramidale; so: stratum oriens. Tukey $p < 0.05$, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses WT en B, y a 6 meses PS1xAPP en D. Barra de escala: 500 μ m en E; 10 μ m en F; 1 μ m en G y 500 nm en H.

Experimentos adicionales de inmunohistoquímica en cortes de hipocampo, desarrollados por el grupo de investigación de la Dra. Antonia Gutiérrez, mostraron que la acumulación de LC3-II observada en animales PS1xAPP durante el envejecimiento tiene lugar en neuritas distróficas en torno a las placas de β -amiloides (ver figura R25.E, paneles E1-E3), coincidiendo con la acumulación de APP/APP-CTFs en estos animales. Experimentos complementarios de microscopía electrónica en el hipocampo de animales PS1xAPP de 6 meses muestran numerosos cuerpos multi-vesiculares rodeados por una doble membrana lipídica y con apariencia de vesículas autofágicas acumulados en neuritas distróficas (figuras R25.F y G) y en terminales sinápticas (figura R25.H) (Boutajangout et al., 2004; Nixon et al., 2005).

Por otra parte, un aumento en LC3-II, como el encontrado en nuestros animales PS1xAPP, podría ocurrir bien como consecuencia de un aumento o potenciación de la vía autofágica, o bien debido a déficits en el aclaramiento de las vesículas autofágicas (Mizushima N. and Yoshimori T., 2007). En este sentido, en el apartado anterior hemos mostrado un incremento en BAG-3 con respecto a BAG-1 dependiente de la edad en ambos genotipos, y en PS1xAPP con respecto a WT, lo que sugiere que la autofagia podría estar activada. Con la finalidad de esclarecer esta cuestión, hemos evaluado la expresión de beclina-1 en el hipocampo de animales WT y PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses. Esta proteína está implicada, junto a Vps-34 y Atg-14, en las etapas iniciales de la autofagia, concretamente en la formación del fagóforo (Itakura E. and Mizushima N., 2009). También se le ha atribuido un papel en la maduración final de los autofagosomas, por lo que beclina-1 podría participar en la regulación del flujo autofágico formando complejos con distintas proteínas (Jaeger et al., 2010; He and Levine, 2010).

RESULTADOS

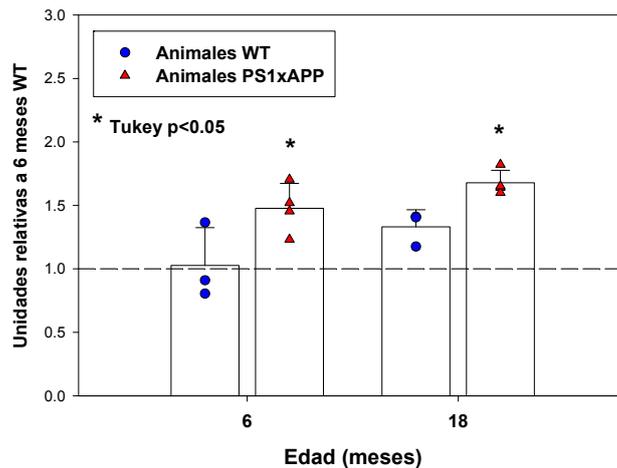


Figura R26. Expresión de mRNA de beclina-1 en el hipocampo de los animales WT y PS1xAPP. La dispersión de puntos representa los datos obtenidos de cada uno de los animales estudiados en cada grupo de edad (5 animales), mientras el gráfico de barras representa la media del grupo. El mRNA de beclina-1 está incrementado de forma estadísticamente significativa en los animales PS1xAPP de 6 y 18 meses con respecto a WT de 6 meses. (*): Tukey $p < 0.05$ denota cambios estadísticamente significativos con respecto a WT de 6 meses.

Como se muestra en la figura R26, la expresión de beclina-1 experimenta un incremento asociado a la edad, tanto en animales WT como en PS1xAPP. Del mismo modo, en los animales PS1xAPP la expresión de beclina-1 es mayor que en WT en todas las edades estudiadas. Por lo tanto, estos resultados coinciden con los previamente obtenidos en BAG-3/BAG-1 y, en conjunto, sugieren que podría existir un aumento de la autofagia en animales PS1xAPP con respecto a WT, y en ambos genotipos durante el proceso de envejecimiento. Sin embargo, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en beclina-1 entre WT y PS1xAPP a los 18 meses sugiere que la acumulación de vesículas autofágicas que tiene lugar en los animales PS1xAPP durante el envejecimiento (no observada en WT) podría estar motivada por otras causas.

4.3 Estudio de las alteraciones del transporte axonal como posible causa de la acumulación de vesículas autofágicas en los animales PS1xAPP.

Como se ha descrito previamente en nuestro modelo PS1xAPP aparecen desde edades muy tempranas (3-4 meses) depósitos extracelulares de β -amiloide, que aumentan progresivamente en tamaño y número con la edad del animal (Baglietto-Vargas et al., 2010). En el hipocampo de los animales PS1xAPP, estos depósitos se concentran mayormente en el stratum oriens y en el hilo del giro dentado, regiones que reciben las proyecciones axonales de las neuronas piramidales y granulares

respectivamente. Paralelo al aumento en la deposición de A β , también observamos un aumento en el número de neuritas distróficas que aparecen bordeando las placas de β -amiloide (Baglietto-Vargas et al., 2010). Estas distrofias podrían ser los sitios celulares donde se acumulan vesículas de naturaleza autofágica (Boutajangout et al., 2004; Nixon et al., 2005; Ma et al., 2010; Sanchez-Varo et al., 2011 aceptado para publicación), en concordancia con la fuerte acumulación de LC3-II descrita en el apartado anterior. Además, la acumulación de vesículas autofágicas en neuritas distróficas y terminales sinápticas podría ser consecuencia de posibles alteraciones en el tráfico vesicular en los axones de las neuronas principales hipocampales. De hecho, las neuritas distróficas, presentes en el hipocampo de los animales PS1xAPP, presentan una intensa tinción para neurofilamentos (subunidad de 150 KDa) y para sinaptofisina (ver figura R27), lo que demuestra que son de origen axonal.

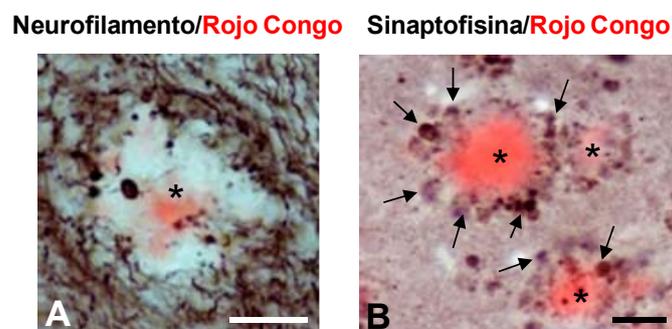


Figura R27. Las distrofias neuríticas que rodean las placas de A β son positivas para neurofilamento y sinaptofisina. Ensayos de inmunohistoquímica muestran que las distrofias que aparecen rodeando las placas de A β en el hipocampo de los animales PS1xAPP son inmuno-positivas para sinaptofisina y neurofilamento, lo que sugiere que deben corresponder a distrofias de origen axonal. Barra de escala: 50 μ m en A y 20 μ m en B.

4.3.1 Evidencias bioquímicas ponen de manifiesto alteraciones en los sistema de transporte axonal de los animales PS1xAPP.

Los mecanismos que podrían llevar a una disfunción en el transporte axonal son múltiples. Por un lado, puede existir una deficiencia asociada a las proteínas motoras (kinesina y dineina), o bien a los microtúbulos por transcurrir el transporte. También podría existir un fallo en la unión de las vesículas o moléculas transportadas a las proteínas motoras, o una disminución en la hidrólisis del ATP necesaria para que tenga lugar este transporte (De Vos et al., 2008).

En este trabajo, abordamos en primer lugar el estudio de la fosforilación de la proteína tau (asociada a microtúbulos (MAP)), mediante WB e inmunohistoquímica,

RESULTADOS

debido a su relevancia en la patología del Alzheimer. La estabilización de los microtúbulos que lleva a cabo tau es necesaria para el mantenimiento de la morfología celular y para el transporte de moléculas y vesículas a través del axón (Baas and Qiang, 2005). En este sentido, la hiperfosforilación de tau conlleva una menor afinidad para unirse a los microtúbulos y promueve el desensamblaje de los mismos (Hernandez and Avila, 2007).

En el desarrollo de estos experimentos, utilizamos proteínas totales de hipocampo animales de 6 y 18 meses, WT y PS1xAPP, incluyendo en paralelo como control positivo una muestra de un animal triple transgénico APP_{695-S}xPS1_{M146V}xtau_{383-P301L} (Oddo et al., 2003). Empleamos los anticuerpos AT8 y AT100 que reconocen distintos residuos de serina y treonina fosforilados de la proteína tau (Zheng-Fischhofer et al., 1998; Clavaguera et al., 2009; Bertrand et al., 2010; Bertrand et al., 2010)). Como se muestra en la figura R28.A, el análisis mediante WB del control positivo mostró una única banda en el caso de AT8, y a una banda prominente en el caso de AT100, ambas con movilidad relativa de 66 KDa (Clavaguera et al., 2009).

Nuestros resultados empleando el anticuerpo AT8 mostraron un ligero incremento, estadísticamente significativo, en los animales PS1xAPP de 6 meses, con respecto a los WT de 6 meses (1.55 ± 0.25 con respecto a WT; $n=3$, ver figura R28.A). También se produjo un aumento similar a los 18 meses en los animales WT, y mucho mayor en los animales PS1xAPP (3.55 ± 0.35 con respecto a WT de 6 meses; $n=3$) (ver figura R28.B). Aunque en estos animales obtuvimos el mayor valor en la fosforilación de tau, en ningún momento llegamos a encontrar formación de ovillos neurofibrilares en los cuerpos neuronales mediante inmunohistoquímica. En este sentido, el estudio inmunohistoquímico de la fosforilación de tau en cortes de hipocampo, mostró que las formas fosforiladas reconocidas por AT8 se concentraban en las neuritas distróficas localizadas en torno a las placas de β -amiloide (ver figura R28.C), tanto en los animales de 6 como de 18 meses PS1xAPP. Por lo tanto este resultado demuestra que la proteína tau hiperfosforilada se encuentra en las distrofias donde tiene lugar la acumulación de vesículas autofágicas.

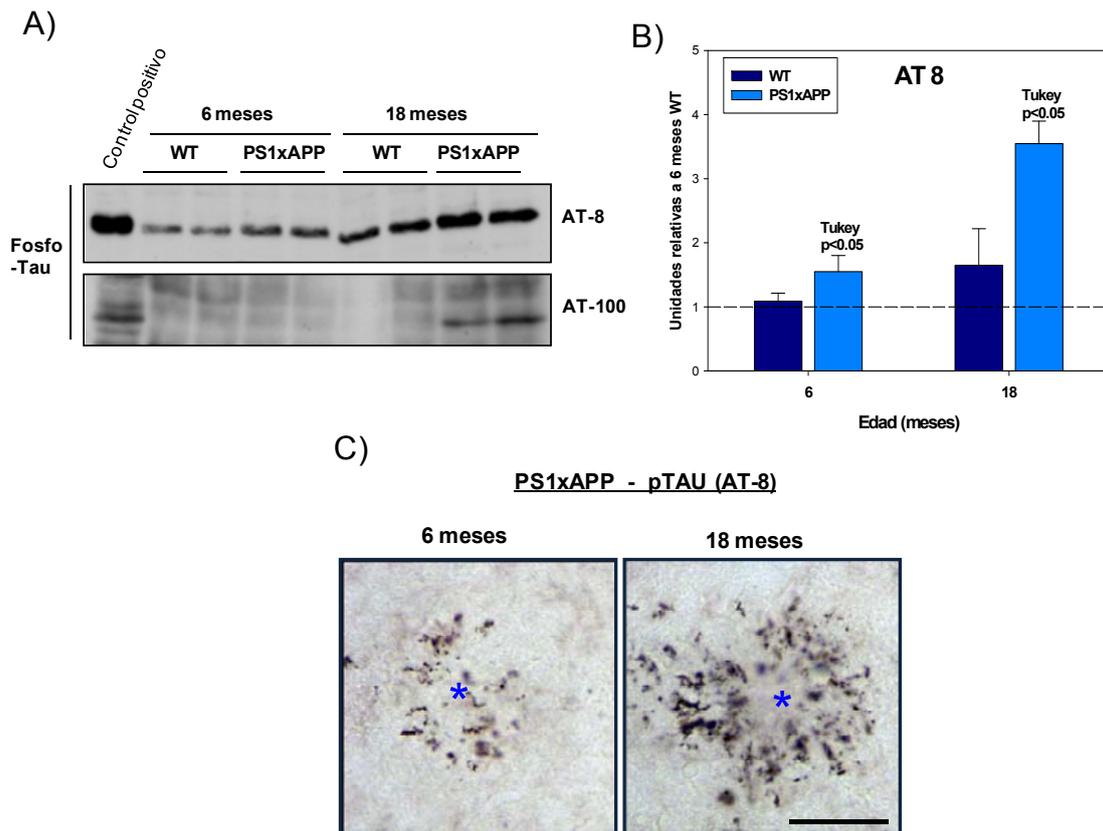


Figura R28. Estudio de la fosforilación de la proteína tau en el hipocampo de los animales PS1xAPP. A) WB representativo de la proteína tau hiperfosforilada en proteínas totales de hipocampo de animales WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses, empleando los anticuerpos AT8 y AT100. Junto a las proteínas objeto de estudio se incorpora también un control positivo (extracto de un animal triple transgénico PS1xAPPxtau). Mientras que la señal correspondiente al epítipo fosforilado reconocido por AT8 se detecta en todos los animales estudiados, el epítipo reconocido por AT100 solo se detecta en PS1xAPP de 18 meses. B) La fosforilación de la proteína tau está fuertemente aumentada en los animales PS1xAPP de 18 meses, y ligeramente en PS1xAPP de 6 meses y WT de 18 meses. C) Ensayos de inmunohistoquímica muestran que la proteína tau hiperfosforilada se acumula en las distrofias axonales que rodean las placas de Aβ en el hipocampo. Tukey p<0.05, cambios estadísticamente significativos con respecto a WT de 6 meses. Barra de escala: 100µm.

Por otra parte, estudiamos mediante WB el epítipo fosforilado de tau reconocido por AT-100, utilizando los mismos extractos que en el estudio con AT-8. Sin embargo, la detección de este epítipo fue más complicada, y nos vimos obligados a emplear una mayor carga de proteína total. En el caso de AT100, no detectamos señal específica en animales WT ni en PS1xAPP de 6 meses, apareciendo la señal exclusivamente en los animales PS1xAPP de 18 meses (ver figura R28.A), por lo que no ha sido posible cuantificar las diferencias reales ligadas al envejecimiento de los animales PS1xAPP. En este sentido, debemos tener en cuenta que la fosforilación de los residuos reconocidos por AT-8 y AT-100 no ocurre por dos mecanismos independientes, sino que la fosforilación de los residuos que reconoce AT-8 es

RESULTADOS

necesaria para que se forme el epítipo que reconoce AT-100 (Zheng-Fischhofer et al., 1998) lo que concuerda con estos resultados.

Por otra parte, estos datos apoyan la disminución descrita previamente en la razón pSer-9-GSK-3 β /GSK-3 β total en animales PS1xAPP de 18 meses (ver figura R5), que deberían, en consecuencia, mostrar una activación de GSK-3 β . Ya que el residuo Thr-212 de tau es sustrato directo de GSK-3 β (Zheng-Fischhofer et al., 1998), el incremento en la inmunoreactividad detectada con el anticuerpo AT-100 en los animales PS1xAPP de 18 meses pone de manifiesto un incremento en la fosforilación del residuo Thr-212, en concordancia con los resultados obtenidos en los experimentos de fosforilación de GSK-3 β . Por lo tanto, este resultado sugiere que el aumento detectado en el epítipo fosforilado de tau reconocido por AT-100 podría estar mediado por el incremento en la actividad enzimática de GSK-3 β en los animales viejos PS1xAPP.

Tras estudiar la proteína tau hiperfosforilada, comprobamos si las deficiencias en el transporte observadas en los animales viejos PS1xAPP podrían tener además otras causas. En este sentido, la proteína motora kinesina-1 está involucrada en el transporte anterógrado rápido de vesículas a través de los microtúbulos de los axones (Vershinin et al., 2007). Para comprobar si existe algún defecto en kinesina en los animales PS1xAPP durante su envejecimiento, cuantificamos mediante WB la cadena pesada de esta proteína en animales WT y PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses. Como se muestra en la figura R29.A, la cadena pesada de kinesina se detecta como un doblete con una movilidad relativa de 120 KDa (Lazarov et al., 2007). Nuestros resultados no revelan cambios significativos en la la cadena pesada de kinesina entre los animales WT de distintas edades (figura R29.B). Sin embargo, como se muestra en la figuras R29.A y R29.B esta proteína disminuyó significativamente en el hipocampo de animales PS1xAPP con respecto a WT, especialmente en 12 y 18 meses. Curiosamente, junto con la disminución de la banda de la cadena pesada de kinesina también observamos la aparición de una banda en torno a 50 KDa, reconocida por el mismo anticuerpo. Esta banda apareció exclusivamente en los animales PS1xAPP, y aumentó con la edad en la misma proporción que disminuyó la banda específica de la cadena pesada de kinesina-1 (ver figura R29.A), lo que sugiere que podría tratarse de un producto de degradación de la misma. En resumen nuestros resultados muestran una deficiencia significativa en la cadena pesada de kinesina-1 en los animales PS1xAPP que parece ser más intensa en los animales de 18 meses. Si además

tenemos en cuenta la aparición de un producto de degradación reconocido por el mismo anticuerpo, podemos sugerir que esta deficiencia posiblemente no se debe a una disminución en la expresión, sino a un aumento en la degradación de la cadena pesada de kinesina-1 asociada a la edad de los animales PS1xAPP.

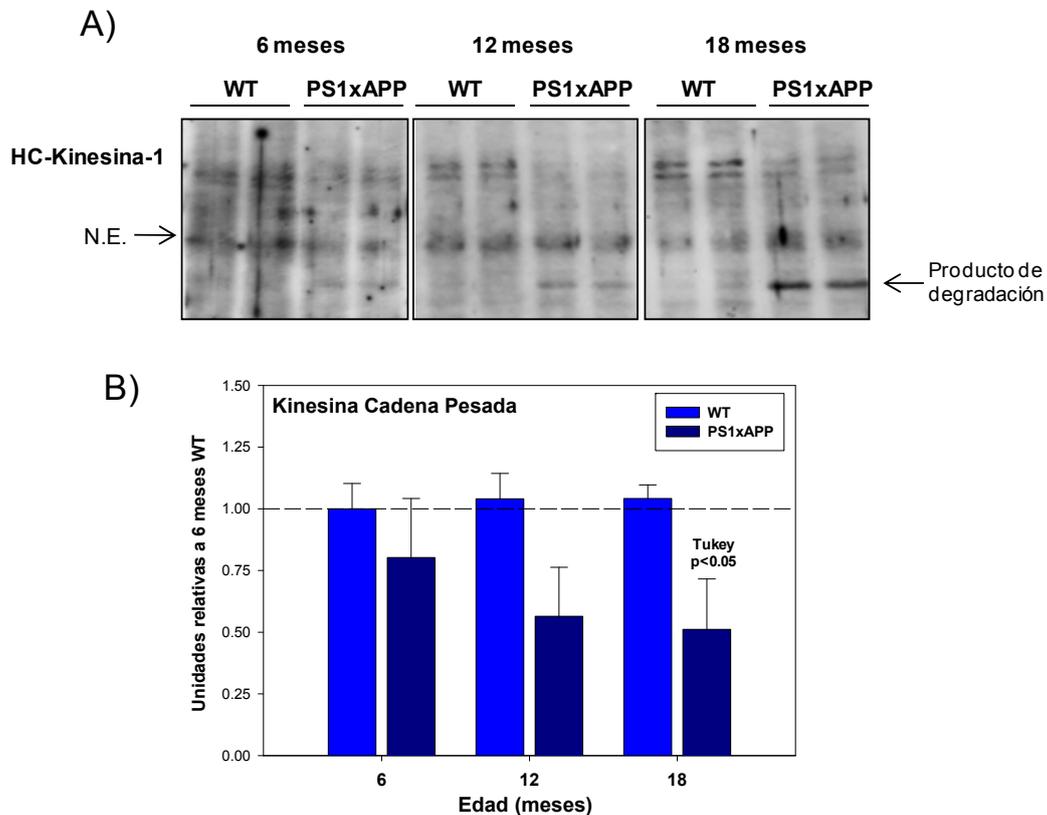


Figura R29. Estudio mediante WB de la cadena pesada de kinesina-1 en animales WT y PS1xAPP. A) WB representativo que muestra un doblete correspondiente a la cadena pesada de kinesina-1. Exclusivamente en los animales PS1xAPP aparece también un producto de degradación que se incrementa en función de la edad estudiada. B) Cuantificación de A. En animales PS1xAPP, asociado al envejecimiento, tiene lugar un fuerte descenso en la intensidad la cadena pesada de kinesina-1, paralelo a la aparición del producto de degradación. Tukey p<0.05 denota cambios estadísticamente significativo con respecto a WT de 6 meses..

Finalmente, centramos nuestra atención en los neurofilamentos, encargados del soporte mecánico de las neuronas y localizados mayoritariamente en los axones. Recientemente, se ha descrito la hiperfosforilación y pérdida de neurofilamentos en los enfermos de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Thangavel et al., 2009), lo que nos llevo a cuestionar la integridad del neurofilamento en los animales PS1xAPP durante el envejecimiento. Haciendo uso de los anticuerpos específicos contra neurofilamento SMI-312 (que reconoce a la forma no fosforilada) y SMI31 (que reconoce la fosforilada), detectamos mediante WB dos bandas correspondientes a la subunidad pesada (200 KDa) y a la subunidad mediana (150 KDa) (ver figuras R30.A y

RESULTADOS

B). Para estos experimentos, empleamos los mismos animales que previamente utilizamos para el estudio de la cadena pesada de kinesina-1. Como se muestra en la figura R30.A y B, en los animales PS1xAPP de 12 y 18 meses se produce una pérdida del neurofilamento no fosforilado con respecto a los animales WT de la misma edad. Por el contrario, no encontramos cambios significativos de la proteína fosforilada, al comparar PS1xAPP frente a WT en las distintas edades estudiadas. En la figura R30.C y D, se muestran los cambios encontrados en la forma fosforilada, no fosforilada y la razón fosfo-NF/no-fosfo-NF en los animales PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses con respecto a WT de 6 meses, para la subunidad pesada y mediana respectivamente. Como esperábamos, la pérdida de la forma no fosforilada que tuvo lugar a 12 y 18 meses en PS1xAPP, se refleja en un aumento de la razón neurofilamento fosforilado/no fosforilado. Observamos resultados similares para NF-M y NF-H (comparar figuras R30.C y D). Estos resultados sugieren que los neurofilamentos se encuentran hiperfosforilados y que posiblemente existe mayor degradación en los animales viejos PS1xAPP. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con las anomalías en el ensamblaje del citoesqueleto axonal, la aparición de distrofias y las deficiencias en el transporte axonal (Sihag et al., 2007).

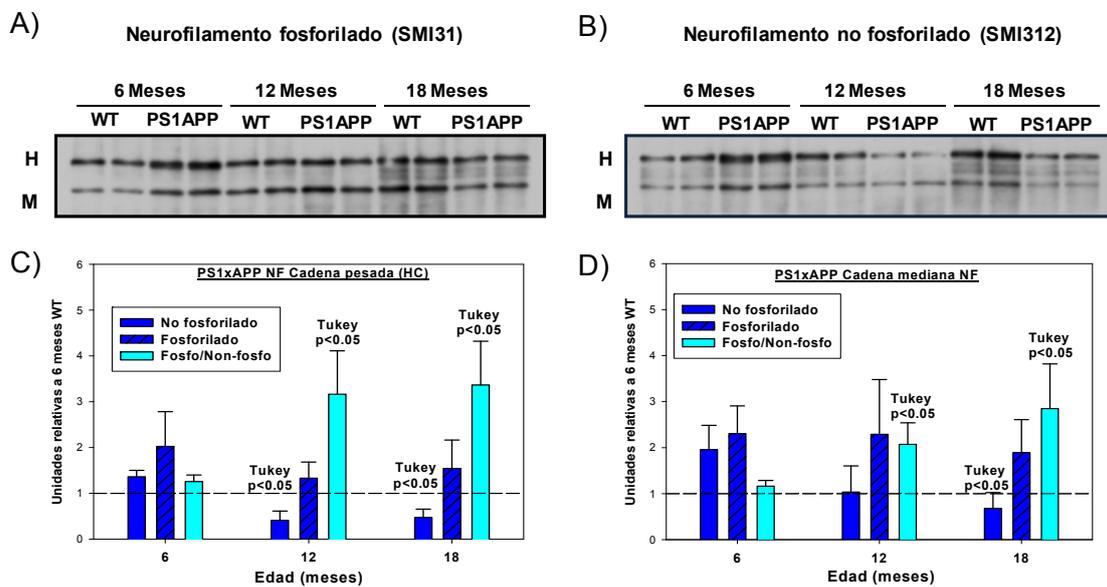


Figura R30. Estudio de la fosforilación de los neurofilamentos en el hipocampo de animales WT y PS1xAPP. A y B) WB representativos muestran la cadena pesada y media de los neurofilamentos no fosfo- y fosforilados en extractos de proteínas totales de hipocampo. C y D) Cuantificación de A y B. La forma no fosforilada de las cadenas pesada y media muestran un descenso significativo en 18 meses, lo que origina un fuerte aumento en la razón fosfo/no-fosfo neurofilamento. Tukey $p < 0.05$ denota cambios estadísticamente significativos.

4.3.2 Consecuencias de la disfunción del transporte axonal en el procesamiento de APP en los animales PS1xAPP.

Para conocer el modo en el que la disfunción del transporte axonal puede afectar al procesamiento de la proteína APP, decidimos abordar una nueva aproximación bioquímica que consiste en separar el contenido de membranas correspondiente a microsomas de los sinaptosomas (ver materiales y métodos; apartado 9.1). En este sentido, los sinaptosomas se producen durante la homogenización del tejido cerebral y engloban predominantemente a los terminales presinápticos. La fracción microsomal supone el resto de compartimentos membranosos de cuerpos neuronales y otras células del sistema nervioso central. Por lo tanto, este fraccionamiento nos va a permitir comparar, no sin limitaciones, las proteínas presentes en las terminales sinápticas (región axonal distal) con las presentes en cuerpos neuronales (región proximal al soma).

Para estos ensayos partimos de cortezas de animales PS1xAPP debido a la necesidad de emplear una cantidad considerable de tejido fresco. Más concretamente, cada muestra analizada fue un pool de micro- o sinaptosomas de 3 animales de cada edad. Tras el fraccionamiento, las muestras de microsomas y sinaptosomas se utilizaron para el análisis mediante WB de las proteínas implicadas en la vía amiloidogénica. Además, en estas muestras también analizamos la presencia del marcador mitocondrial ATP-sintetasa- β con la finalidad de conocer la integridad de los sinaptosomas aislados (ver figura R31.A y apartado 9.1 de materiales y métodos).

En la figura R31.A se muestran los resultados obtenidos a partir de las muestras de este fraccionamiento. Nuestros resultados mostraron una acumulación de APP-FL y C99 similar en microsomas y sinaptosomas durante el proceso de envejecimiento de los animales PS1xAPP. Además, ambas proteínas muestran una acumulación a los 18 meses similar a la previamente mostrada en extractos de proteínas totales. Por otra parte, el proceso de fraccionamiento utilizado puso de manifiesto algunas diferencias en la distribución de APP, C99 y A β entre micro- y sinaptosomas. En este sentido, nuestros resultados mostraron que en animales de 6 meses APP-FL se distribuye de forma equitativa entre ambas fracciones, mientras que en los de 18 meses, es mayoritaria en microsomas (figura R31.B). Una diferencia más acusada encontramos tras el estudio de C99. Este fragmento C-terminal aparece muy concentrado en microsomas con respecto a sinaptosomas en todas las edades estudiadas. Más concretamente, la cantidad encontrada en sinaptosomas corresponde

RESULTADOS

al $44.6 \pm 5.2\%$ ($n=3$) del fragmento C99 presente en la fracción microsomal en los animales PS1xAPP de 6 meses (figura R31.B), sin encontrar diferencias significativas en esta distribución durante el envejecimiento.

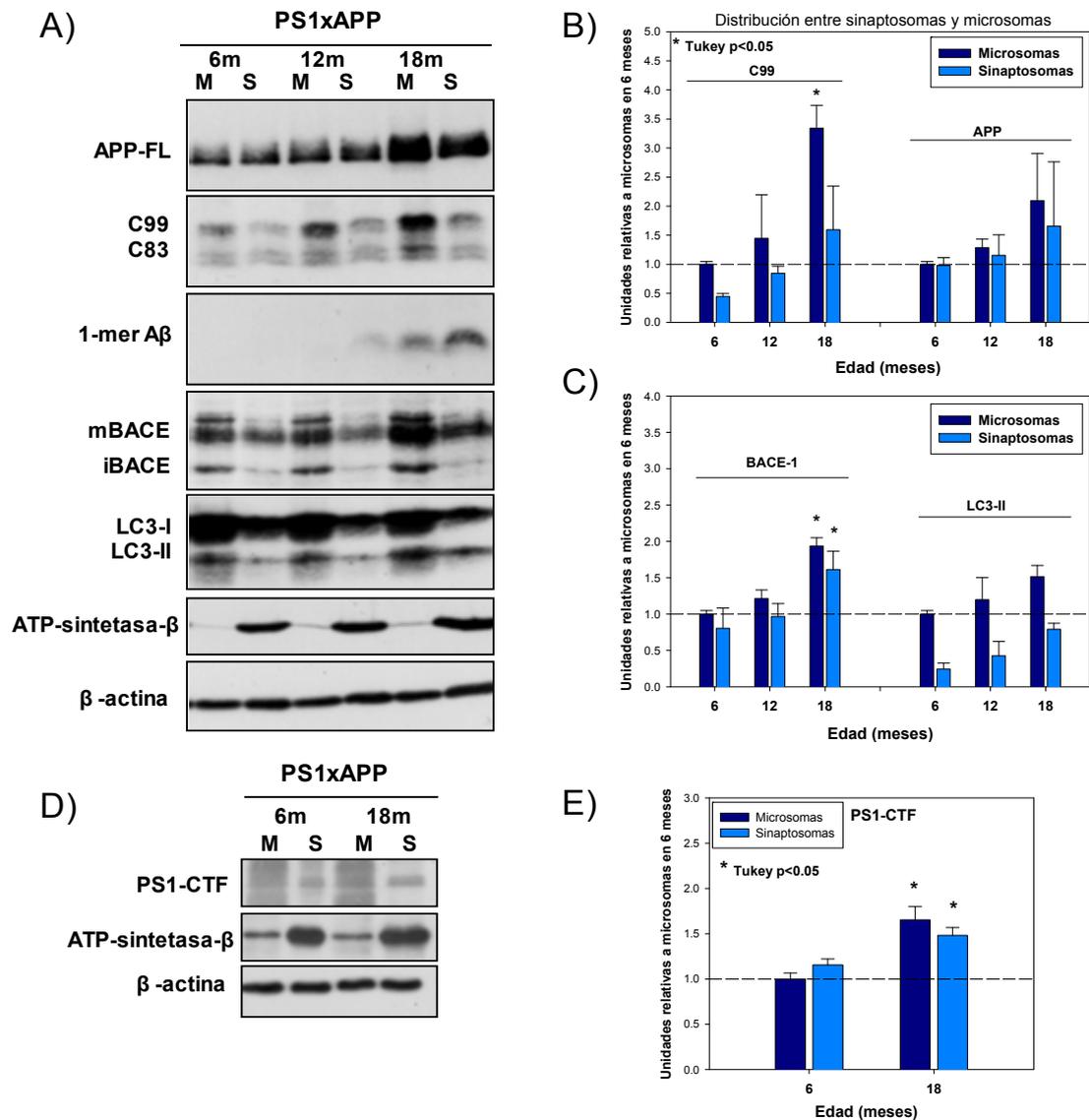


Figura R31. Fraccionamiento entre micro- y sinaptosomas del contenido de membranas en animales PS1xAPP. A y D) WB representativos de APP-FL, APP-CTFs, Aβ monomérico, BACE y ATP-sintetasa-β (A), así como de PS1-CTF (B) en micro- y sinaptosomas de animales de distintas edades. Todos estos marcadores se acumulan durante el envejecimiento de forma similar a lo observado previamente en proteínas totales. B) Tanto APP-FL como C99 se distribuyen preferentemente en microsomas. C) BACE-1 se distribuye de forma similar entre micro- y sinaptosomas, aunque se encontró ligeramente más en microsomas. Por el contrario, la mayor parte de LC3-II se muestra en microsomas, lo que sugiere que el contenido de vesículas autofágicas acumuladas en los animales PS1xAPP debe encontrarse en microsomas. E) PS1-CTF se distribuye de forma similar entre micro y sinaptosomas, al igual que BACE-1. (*): Tukey $p < 0.05$ denota cambios estadísticamente significativos.

Finalmente, estudiamos la forma monomérica (1-mer) del péptido Aβ en estas mismas muestras. Bajo nuestras condiciones experimentales solo detectamos la

presencia de A β en los animales de 18 meses y en menor grado en los de 12 meses (figura R31.A), por lo que nos fue imposible cuantificar el incremento entre 6 y 18 meses. Como se muestra en la figura R31.A, los animales viejos PS1xAPP presentaron mayor concentración de A β en la fracción sinaptosomal que microsomal ($211\pm 77\%$ respecto a microsomas; $n=2$), en contraste con lo observado para C99 y APP-FL. Estos resultados sugieren que el procesamiento amiloidogénico podría tener lugar durante el transporte axonal de aquellas vesículas que contengan los precursores de A β y la maquinaria enzimática necesaria. Por otra parte, la acumulación encontrada de péptido A β monomérico en sinaptosomas de 18 meses sugiere que al menos una parte de estas vesículas deben producir β -amiloides, probablemente en los estadios finales del transporte axonal anterogrado a nivel de las sinapsis (Cirrito et al., 2005; Cirrito et al., 2008).

Si bien en el caso de APP-FL y sus derivados podemos asumir que el contenido presente en la fracción microsomal es procedente de neuronas ya que la proteína APP es transgénica y se expresa bajo el promotor Thy-1, para otros marcadores estudiados como BACE-1, PS1 o LC3 no podemos asumir esta regla simple, debido a que la procedencia puede ser diversa. Por el contrario, los sinaptosomas son de origen sináptico, y por lo tanto podemos asumir que las proteínas estudiadas en estas muestras deben ser mayormente de origen neuronal.

En este sentido, los animales viejos PS1xAPP presentaron una acumulación de la forma madura de BACE-1 y de PS1-CTF tanto en micro- como en sinaptosomas semejante a la previamente descrita en extractos de proteínas totales de hipocampo. En lo que respecta a la distribución, la forma madura BACE-1 se encontró ligeramente más concentrada en microsomas en todas las edades estudiadas, aunque la diferencia entre ambos no fue significativa (figura R31.A y C). Del mismo modo, el fragmento PS1-CTF presenta una distribución similar entre micro- y sinaptosomas, aunque en este caso PS1-CTF se encuentra ligeramente más enriquecido en la fracción sinaptosomal (figura R31.D y E). Estos resultados sugieren que el procesamiento β - y γ -secretasa tiene lugar tanto en la región más proximal al soma como en la más distal.

Finalmente, estudiamos la proteína LC3-II en estas mismas muestras. Lo más destacable parece ser la clara distribución de LC3-II en microsomas, mientras la cantidad detectada en sinaptosomas supone un $24\pm 8.2\%$ en 6 meses y un $52.3\pm 8.1\%$ en 18 meses con respecto a la proteína LC3-II presente en microsomas ($n=3$) (figura R31.A). Estos datos sugieren que la mayor parte de las vesículas autofágicas, que a

RESULTADOS

nivel histológico se encuentra principalmente entre cuerpos neuronales, dendritas apicales y distrofias axonales (ver figura R25.E), deben encontrarse incluidas en la fracción microsomal. Por otra parte, las diferencias encontradas en la distribución de LC3-II entre animales jóvenes y viejos se deben a la diferente acumulación que muestra LC3-II en estas preparaciones durante el envejecimiento de los animales. En este sentido, como se muestra en la figura R31.C, la proteína LC3-II experimenta una acumulación en 18 meses de 1.51 ± 0.15 en microsomas, y 3.29 ± 0.08 en sinaptosomas, respecto a los animales de 6 meses. La acumulación de LC3-II mostrada en los sinaptosomas de los animales de 18 meses recuerda en gran medida a los resultados previamente obtenidos en extractos de proteínas totales de hipocampo. Sin embargo, el incremento encontrado en microsomas es notablemente inferior. Los factores que pueden influir en este resultado son desconocidos, aunque suponemos que la diferente densidad que podrían mostrar estas vesículas en función de la edad de los animales podría dar lugar a un mayor desplazamiento de estas vesículas hacia los sinaptosomas, lo que podría justificar la leve acumulación que tiene lugar en los microsomas.

En conclusión, en este apartado aportamos resultados que muestran como el procesamiento de la proteína APP se encuentra alterado como causa de las alteraciones del transporte vesicular axonal en los animales PS1xAPP durante su envejecimiento. Junto con la acumulación de LC3-II en microsomas y sinaptosomas también se observó una acumulación de los precursores del β -amiloide en microsomas y de A β en sinaptosomas. Estos resultados en conjunto sugieren que mientras las vesículas acumuladas en la región neuronal proximal al soma (posiblemente axones distróficos) presentan acumulación de APP-FL y C99, las vesículas acumuladas en la porción más distal (terminales sinápticas) podrían acumular β -amiloide.

4.4 APP y APP-CTFs se localizan en vesículas autofágicas en los animales PS1xAPP de 18 meses.

Durante el desarrollo de este trabajo, hemos recopilado algunas evidencias que sugieren que las vesículas autofágicas acumuladas en los animales PS1xAPP podrían ser compartimentos celulares donde tiene lugar la producción y acumulación de A β . En este sentido, hemos descrito previamente que la acumulación de APP/APP-CTFs tiene lugar preferentemente en las neuritas distróficas que rodean las placas de β -amiloide, coincidiendo con la acumulación de vesículas autofágicas durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP (comparar figuras R9.E y R25.E). Del mismo modo, también

hemos mostrado que APP-FL, C99, BACE-1 y PS1-CTF se acumulan en una fracción de proteínas de membrana resistentes a CHAPS junto con LC3-II, lo que de nuevo sugiere la asociación entre la producción de β -amiloide y las vesículas autofágicas (comparar figuras R21 y R25.E). En este apartado mostramos nuevas evidencias que apoyan esta asociación.

Para intentar relacionar la ruta de la autofagia con la producción intracelular de β -amiloide, pasamos a fraccionar el contenido microsomal de un pool de 3 animales de 18 meses PS1xAPP en un gradiente de densidad preparado con iodixanol (ver materiales y métodos, apartado 9.2). Una vez realizado el fraccionamiento, se toman distintas fracciones del gradiente, desde la parte superior (1), hasta la parte inferior (10), y estudiamos en ellas mediante WB la presencia de las proteínas implicadas en la vía amiloidogénica. Como se observa en la figura R32.A, tanto APP como APP-CTFs mostraron capacidad para flotar en el gradiente, y aunque varias de las fracciones son inmuno-positivas, ambos precursores mostraron un pico de concentración en la fracción 4 (ver figura R32.B). El estudio del péptido β -amiloide lo abordamos en primer lugar empleando geles de poliacrilamida-SDS, membranas de nitrocelulosa y el anticuerpo 6E10 (figura R32.A; tercer panel). Nuestros resultados mostraron la presencia de A β en el fondo del gradiente (ver figura R32.B). En una segunda aproximación, empleamos un gel de poliacrilamida-SDS-UREA, membranas de PVDF y el anticuerpo 82E1 (figura R32.A; cuarto panel). Con esta aproximación conseguimos amplificar la señal de A β monomérico y confirmamos que la mayor parte se concentraba en el fondo del gradiente. Sin embargo, en esta ocasión encontramos una pequeña proporción de A β con capacidad para flotar. Menos del 10% del β -amiloide total fraccionado presenta co-localización con C99 y APP-FL en la fracción 4 del gradiente (figura R32.B).

Los resultados obtenidos para el péptido A β en gradiente de iodixanol sugieren en principio dos posibilidades. La primera, que durante el tratamiento de la muestra siguiendo esta metodología podría producirse una rotura parcial o total de las vesículas/orgánulos celulares con la consecuente liberación de las proteínas solubles como el péptido A β . La segunda, que la muestra de membranas objeto del fraccionamiento se encuentre contaminada por β -amiloide procedente de las placas extracelulares. Aunque ambas opciones podrían explicar la pequeña proporción de A β con capacidad para flotar y la presencia mayoritaria de A β en las fracciones más densas del gradiente, esta última es menos probable puesto que la preparación de

RESULTADOS

membranas ha sido previamente sometida a centrifugación a 12600 xg (ver materiales y métodos; apartado 9.2).

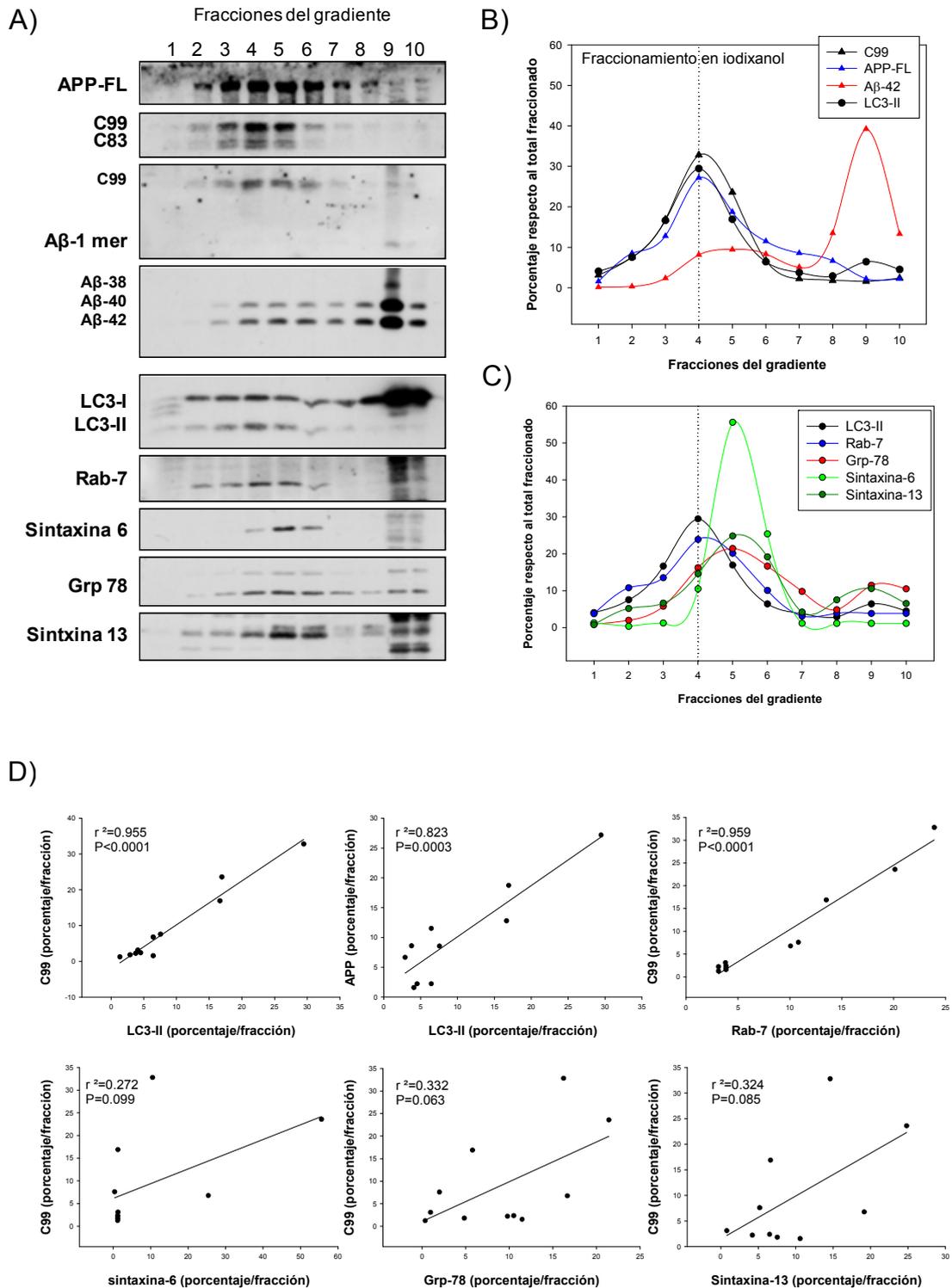


Figura R32. Fraccionamiento del contenido vesicular microsomal en gradiente de iodoxanol en animales PS1xAPP viejos. A) WB representativo de APP-FL, APP-CTFs, A β monomérico (fraccionado en gel de urea), LC3, Rab-7, sintaxina-6, Grp-78 y sintaxina-13 en las fracciones obtenidas mediante fraccionamiento de microsomas de un pool de 3 animales PS1xAPP de 18 meses en gradiente continuo de iodoxanol. B) APP-FL y C99, pero no Abeta, se distribuyen en el mismo rango de densidad. C) El estudio de otros marcadores muestra que Rab-7 también se diferencia en el mismo rango de densidad lo que sugiere que podría tratarse de vesículas autofágicas maduras. Los demás marcadores estudiados se distribuyen en otra fracción. D) APP-FL y C99 presentan una colocalización estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) con LC3-II y Rab-7, pero no con otros marcadores de orgánulos.

Para intentar discriminar los posibles compartimentos celulares en los que puede tener lugar la acumulación de APP-FL, C99 y el β -amiloide, pasamos a estudiar distintos marcadores de orgánulos celulares en las mismas fracciones del gradiente. Como esperábamos, tanto APP como C99 colocalizaron con LC3-II en las mismas fracciones del gradiente (ver figuras R32.A y R32.B). En el caso de C99 y LC3-II, ambos marcadores presentan una relación lineal casi perfecta (r^2 : 0.95; $p < 0.0001$) (ver figura R32.D). También fueron testados mediante WB otros marcadores de orgánulos como sintaxina-6 para trans-golgi, Grp-78 para retículo endoplásmico y sintaxina-13 para endosomas (ver figura R32.A), que mostraron co-localización parcial con C99 y APP-FL. Sin embargo, todos ellos presentaron su pico máximo de concentración en una fracción diferente (ver figura R32.C), y ninguno mostró una relación lineal aceptable con C99 (ver figura R32.D). Finalmente, estudiamos en las fracciones del gradiente de iodoxanol Rab-7, proteína implicada en la fusión de los autofagosomas y los lisosomas (Kimura et al., 2007) (ver figura R32.A). Al igual que observamos para LC3-II, Rab-7 también apareció enriquecida en la fracción 4 del gradiente (ver figura R32.C). Además, la representación de los valores de C99 frente a Rab-7 también mostró una regresión lineal estadísticamente significativa (r^2 : 0.95; $p < 0.0001$; ver figura R32.D). Estos resultados obtenidos a partir de la fracción microsomal de animales PS1xAPP de 18 meses demuestran que APP-FL y, especialmente C99, se distribuyen en función de su densidad en un rango que coincide con el marcador de vesículas autofágicas LC3-II, y con la proteína Rab7 implicada en la fusión de autofagosomas y lisosomas. Estos resultados además se refuerzan por estudios de microscopia electrónica en animales PS1xAPP de 6 meses realizados por el grupo de investigación de la Dra. Antonia Gutiérrez que muestran que las vesículas autofágicas acumuladas en neuritas distróficas son inmunopositivas para APP/APP-CTFs (figuras R33.A y B). Por lo tanto, en conjunto estos datos sugieren que la mayor parte de APP y C99 (y una pequeña proporción de A β) acumulados en los animales viejos PS1xAPP debe encontrarse vesiculado en autofagosomas presentes en las distrofias axonales.

RESULTADOS

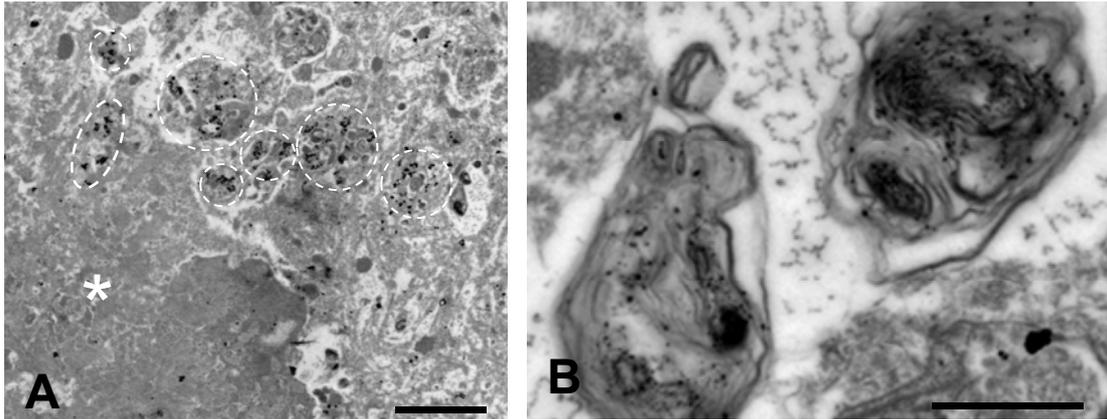


Figura R33. Inmunotinción para APP-FL/APP-CTFs visualizada con microscopía electrónica. A) La inmunotinción se detectó mediante anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro en torno a placas de A β en el hipocampo de animales PS1xAPP de 6 meses. B) Las vesículas acumuladas muestran morfología de autofagosomas y una intensa tinción intraluminal para APP/APP-CTFs. Barra de escala: 500nm..

Finalmente, para demostrar que los precursores del péptido β -amiloide se acumulan en vesículas autofágicas durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP, pasamos a aislar muestras enriquecidas en estas vesículas a partir de animales PS1xAPP de distintas edades. Para ello, calculamos el rango de densidad en el que se diferencian las vesículas autofágicas partiendo de nuestros propios resultados en células de neuroblastomas N2a (ver materiales y métodos; apartado 9.2.4) y de los previamente obtenidos por otros autores (Wattiaux et al., 1978; Marzella et al., 1982). A continuación, adaptamos nuestro protocolo de aislamiento de sinaptosomas aumentando la velocidad de obtención del extracto crudo mitocondrial hasta 17000 g (Yang et al., 2009), (ver materiales y métodos; apartado 9.3). Desafortunadamente, para el aislamiento de estas muestras nos vimos obligados a recurrir a otro modelo murino PS1xAPP (PS1 $_{\Delta\text{exon9}}$ xAPP $_{695\text{-S}}$) similar al que hemos empleado rutinariamente en este trabajo.

Como se muestra en la figura R34.A, la proteína LC3-II y los precursores del péptido β -amiloide APP-FL y C99 se encuentran enriquecidos en la nueva fracción obtenida empleando este protocolo a partir de animales PS1xAPP de 12 meses. Este resultado sugiere que vesículas autofágicas con APP-FL y APP-CTFs, previamente localizadas en fracción microsomal, deben desplazarse a la fracción de sinaptosomas tras aumentar la velocidad de centrifugación (ver figura R34.B y comparar con figuras R31.B y C). Por tanto, la fracción así obtenida debe contener sinaptosomas y la mayor parte de las vesículas autofágicas presentes en el homogenado de partida. Por este motivo, a esta fracción la denominamos fracción enriquecida en vesículas autofágicas.

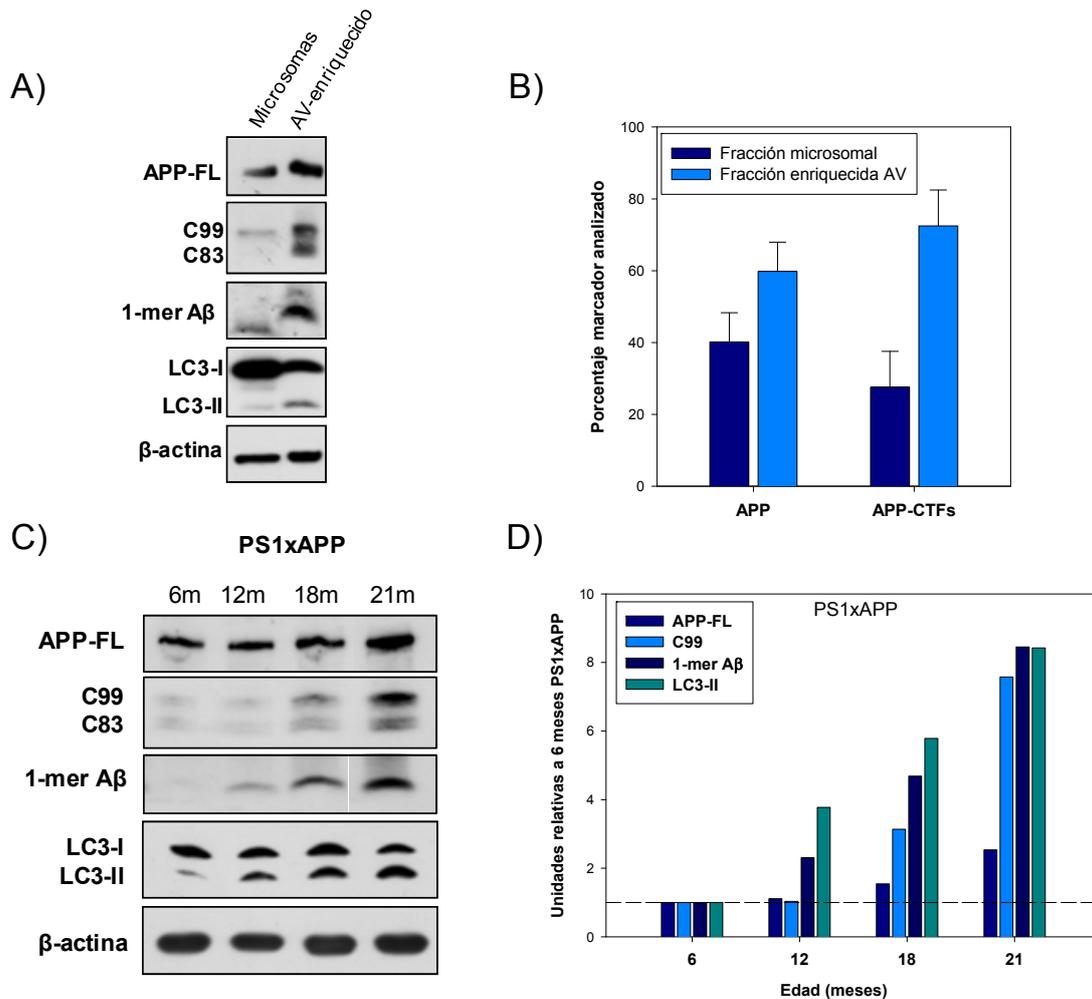


Figura R34. Aislamiento de una fracción enriquecida en vesículas autofágicas en animales PS1xAPP. A) WB representativo de APP-FL, APP-CTFs, A β monomérico y LC3-II en la muestra enriquecida en vesículas autofágicas y en los microsomas restantes en animales PS1xAPP de 12 meses. B) La distribución de APP-FL y APP-CTFs es mayoritaria en la fracción enriquecida en vesículas autofágicas en un animal de 12 meses. C) WB representativo de la acumulación de APP-FL; APP-CTFs, A β monomérico y LC3-II durante el envejecimiento. D) Esta fracción presenta una fuerte acumulación de LC3-II, y en paralelo tiene lugar también la acumulación de APP-FL, C99 y A β . El resultado mostrado es obtenido de un único pool de 3 animales (por ello no se presenta SD o estadística).

A continuación, obtuvimos este tipo de muestra de animales PS1xAPP de 6, 12, 18 y 21 meses, para llevar a cabo el análisis de APP-FL, APP-CTFs y β -amiloide monomérico. Una vez aisladas, preparamos un pool de tres animales para cada edad estudiada. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R34.B, y de forma cuantitativa en R34.D. Como esperábamos, en estas muestras encontramos una fuerte acumulación del marcador de vesículas autofágicas LC3-II (figura R34.D). Por el contrario, no encontramos ningún cambio significativo durante el análisis de β -actina, que debe proceder mayoritariamente de los sinaptosomas presentes en estas muestras. Por otro lado, pasamos a analizar la acumulación de APP-FL, APP-CTFs y

RESULTADOS

A β monomérico. De forma similar a lo descrito para LC3-II, tanto C99 como A β mostraron una fuerte acumulación en los animales de 21 meses con respecto a 6 meses (figura R34.D), y en menor grado APP-FL. El fragmento C83 también se acumula en esta fracción, aunque no tanto como C99, lo que es indicativo de que esta acumulación no corresponde exclusivamente a los componentes de la vía amiloidogénica. Estos resultados nos permiten asociar la acumulación de vesículas autofágicas con la de C99 y APP-FL durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. Conjuntamente, los resultados descritos en este apartado demuestran que los precursores del péptido A β se acumulan en los animales PS1xAPP en vesículas autofágicas presentes en neuritas distróficas durante el proceso de envejecimiento.

En el caso del β -amiloide monomérico, esta metodología no nos permite establecer una relación directa entre su acumulación y las vesículas autofágicas porque estos péptidos se localizan principalmente en sinaptosomas antes de llevar a cabo este protocolo (ver figura R31.A; apartado 4). Teniendo además en cuenta los resultados obtenidos en gradientes de iodixanol, no podemos concluir que el péptido A β se localice en este tipo de vesículas en los animales PS1xAPP. Sin embargo, los resultados de APP-FL y C99 sugieren que la producción de β -amiloide podría ocurrir en estas vesículas, lo que además estaría en concordancia con el fuerte incremento encontrado en LC3-II y A β monomérico en los sinaptosomas de animales viejos PS1xAPP.

4.4.1 La maduración de la subunidad V0a1 de la bomba de protones vesicular está impedida durante el envejecimiento en los animales PS1xAPP.

La maduración de las vesículas autofágicas hasta fusionarse con los lisosomas es un evento necesario para que tenga lugar la degradación de su contenido. En este sentido, aunque los precursores del β -amiloide acumulados en estas vesículas se degradan por vía lisosomal (Yang et al., 2011), la acumulación observada durante el envejecimiento en animales PS1xAPP, sugiere que esta degradación no es eficiente. Por una parte, los problemas en el transporte axonal asociados a la edad podrían explicar un déficit en la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Por otra parte, esta acumulación de APP y C99 también podría explicarse por deficiencias en la degradación vía lisosomal asociadas a la edad de los animales PS1xAPP. En este sentido, la acidificación de los lisosomas por parte de la bomba de protones es un requisito necesario para que se produzca la maduración de las enzimas lisosomales y para que tenga lugar la fusión de las vesículas autofágicas con los lisosomas

(Yamamoto A et al., 1998; Peri and Nessler-Volhard, 2008). La subunidad V0a1 es una subunidad reguladora de la bomba de protones en cerebro (Toei et al., 2010 para revisión), y su maduración está ligada a la actividad enzimática de presenilina/ γ -secretasa (Lee et al., 2010), lo que la hace un candidato idóneo para el estudio en nuestros animales.

El estudio de la subunidad V0a1 de la bomba de protones se llevo a cabo mediante PCR y WB (figura R35). Para el estudio a nivel transcripcional empleamos muestras de cDNA de hipocampo de WT y PS1xAPP de 6 y 18 meses. Como se muestra en la figura R35.A, la expresión de esta subunidad está aumentada de forma estadísticamente significativa en animales WT y PS1xAPP de 18 meses con respecto a WT de 6 meses, aunque en estos últimos el incremento fue algo mayor. Por el contrario, en los animales de 6 meses PS1xAPP no encontramos diferencia de expresión con respecto a WT.

El estudio mediante WB de la subunidad V0a1 de la bomba de protones vesicular revela una banda difusa en torno a 116 KDa correspondiente a la forma madura (glicosilada), mientras la forma inmadura se observa como una banda bien definida de peso molecular ligeramente inferior (Lee et al., 2010). Como se muestra en la figura R35.B, y cuantitativamente en R35.C, la forma madura de V0a1 experimenta un fuerte incremento en los animales PS1xAPP de 6 meses con respecto a WT de la misma edad, un incremento moderado durante el envejecimiento de los animales WT, así como un descenso estadísticamente significativo durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP, alcanzándose a los 18 meses prácticamente el valor basal de los animales WT de 6 meses (ver figuras R35.B y C). Estos resultados podrían reflejar un déficit en la acidificación de lisosomas en los animales PS1xAPP de 18 meses con respecto a los jóvenes.

RESULTADOS

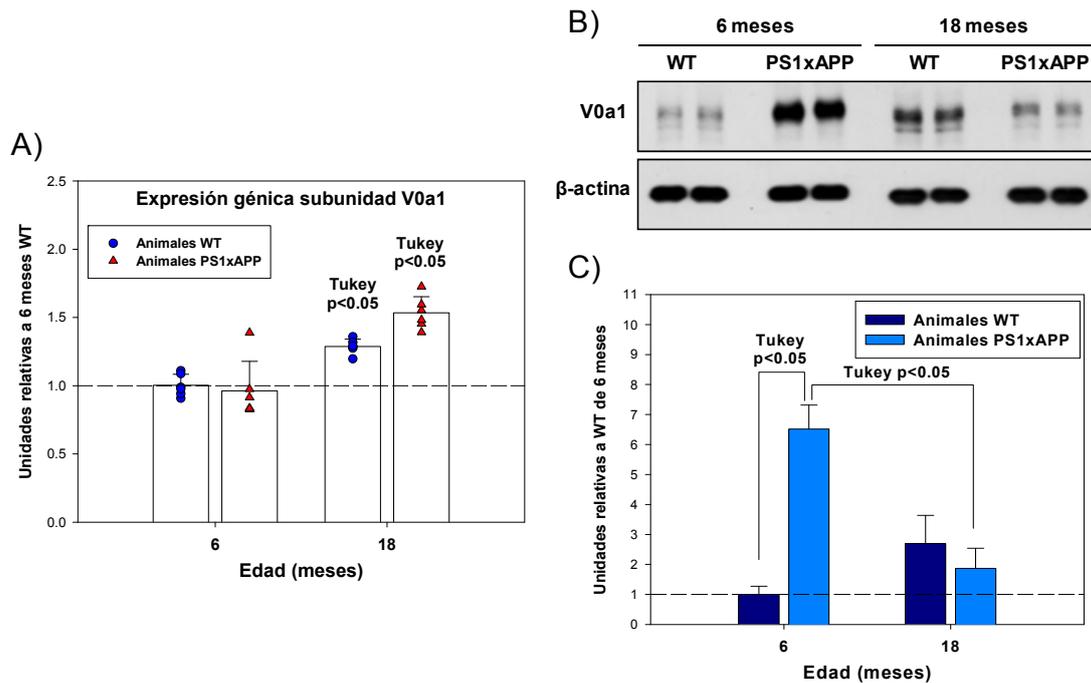


Figura R35. Estudio de la subunidad V0a1 de la bomba de protones vesicular en el hipocampo de animales WT y PS1xAPP. A) Expresión de mRNA. La dispersión de puntos representa cada uno de los animales estudiados en cada grupo de edad (5-10 animales), mientras el gráfico de barras representa la media del grupo. El mRNA de V0a1 está incrementado significativamente en animales WT y PS1xAPP de 18 meses con respecto a WT de 6 meses. B) WB representativo de la forma madura de la subunidad V0a1 en animales de 6 y 18 meses. La banda discreta de menor peso molecular podría representar la forma inmadura. C) La presencia de la forma madura está aumentada en PS1xAPP de 6 meses y experimenta una fuerte caída durante el envejecimiento. Tukey $p < 0.05$ cambios estadísticamente significativos entre WT y PS1xAPP a 6 meses, o entre PS1xAPP de 6 y 18 meses.

Teniendo en cuenta que no hemos encontrado diferencias a nivel transcripcional entre los animales WT y PS1xAPP de 6 meses en la subunidad V0a1, el aumento detectado mediante WB en los animales PS1xAPP jóvenes podría estar motivado por un incremento en la maduración de esta subunidad. Este incremento en la forma madura podría traducirse en un aumento de la eficiencia de degradación por vía lisosomal en animales jóvenes PS1xAPP, lo que sugiere cierta relación con el incremento en BAG3 (respecto a BAG-1) y beclina-1 en estos animales. Sin embargo, en los animales viejos PS1xAPP tendría lugar una pérdida de la eficiencia en la degradación por vía lisosomal, aun cuando la razón BAG3/BAG1 y beclina-1 se encuentran aumentados en estos animales. En definitiva estos resultados sugieren que la acumulación de vesículas autofágicas conteniendo APP y C99 en los animales viejos PS1xAPP también podría deberse a un fallo en la maduración de estas vesículas.

4.4.2 El fallo en la acidificación de las vesículas en una línea celular de neuroblastoma lleva a la acumulación de APP-CTFs y de PS1-CTF.

Con el fin de establecer una relación entre una posible deficiencia en la acidificación de lisosomas dependiente de la edad con la acumulación de las proteínas implicadas en la ruta amiloidogénica, realizamos experimentos en cultivos celulares inhibiendo la acidificación de los lisosomas con cloroquina. Esta droga ha sido muy utilizada para inhibir la degradación vía lisosomal (Vingtdeux et al., 2007; Boland et al., 2010), ya que al alcalinizar el pH de los lisosomas, inhibe la actividad de sus enzimas (Diwu Z et al., 2011).

Estos experimentos se realizaron en dos líneas celulares diferentes; por un lado empleamos células de neuroblastomas N2a establemente transfectadas con APPsw (N2a+APPsw) para estudiar la posible acumulación de APP, APP-CTFs y A β tras el tratamiento con cloroquina. Por otro lado, hemos empleado fibroblastos murinos carentes de presenilinas endógenas (dobles KOs para PS) y establemente transfectados con presenilina-1 humana wild-type (MEF+H-PS1) (cedidas por el Dr. B. De Strooper), con la finalidad de estudiar la acumulación de PS1-CTF tras el mismo tratamiento. El tratamiento se llevó a cabo durante 6 y 24 horas. Pasado este tiempo, las células se recogieron empleando *Tripure*® (ver materiales y métodos; apartado 20).

Como se muestra en la figura R36.A y cuantitativamente en R36.B, el tratamiento (24 horas) de las células N2a-APPsw con cloroquina produjo la acumulación tanto de APP-FL como de los fragmentos C-terminales. Los fragmentos C-terminales de APP aparecen como una serie de bandas discretas en torno a 15 KDa reconocidas por el anticuerpo contra APP-CTFs (Boland et al., 2010). Para saber si el tratamiento con cloroquina indujo la acumulación intracelular de péptido A β , pasamos analizar la forma monomérica del mismo mediante WB y empleando membranas de PVDF. Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales, no conseguimos detectar acumulación de A β empleando los anticuerpos 6E10 u 82E1.

Finalmente, ensayamos la posibilidad de que un fallo en la acidificación también pudiese estar implicado en la acumulación del complejo γ -secretasa. Para ello analizamos como se acumula el fragmento C-terminal de PS1 tras el tratamiento con cloroquina en la células MEF+H-PS1. Como se muestra en la figura R36.C, y

RESULTADOS

cuantitativamente en R36.D, el tratamiento con cloroquina también dio lugar a una acumulación del fragmento PS1-CTF tanto a 6 como a 24 horas.

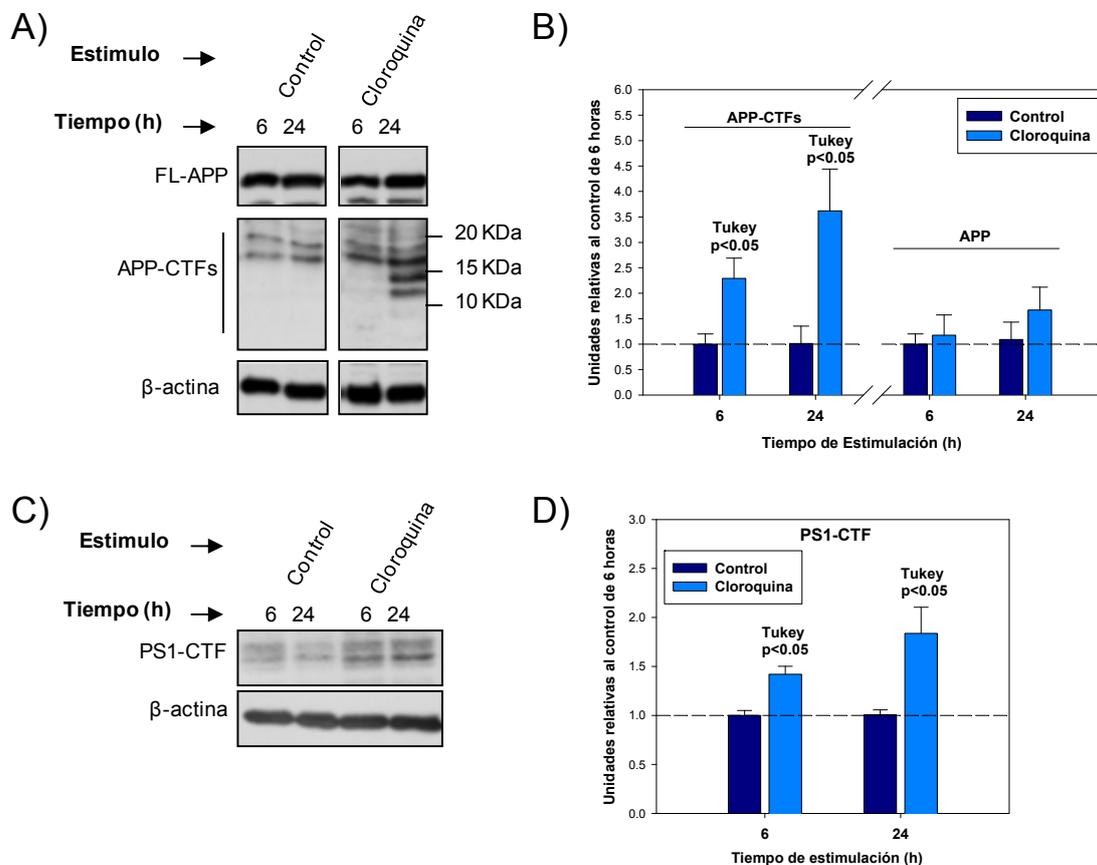


Figura R36. Estudio de los efectos de la cloroquina sobre el aclaramiento de los precursores de A β en cultivos de N2a. A y C) WB representativo de APP y APP-CTFs, o PS1-CTF, en proteínas extraídas tras el tratamiento con cloroquina durante 6 y 24 horas sobre células N2a transfectadas con APPsw. B y D) Tanto APP/APP-CTFs como PS1-CTF muestran acumulación cuando se inhibe la degradación por vía lisosomal mediante cloroquina in vitro, especialmente a las 24 horas de tratamiento. Los ensayos de estimulación sobre N2a se han repetido 2 veces bajo las mismas condiciones experimentales. Tukey $p < 0.05$ denota cambios estadísticamente significativos con respecto al control no estimulado.

Estos resultados demuestran que la degradación de APP y sus fragmentos proteolíticos se produce vía lisosomal (Vingtdeux et al., 2007). En consecuencia, deficiencias o limitaciones en la acidificación de los lisosomas puede llevar a una acumulación de APP-FL y APP-CTFs, así como del fragmento PS1-CTF asociado al complejo γ -secretasa maduro. Si tenemos en cuenta la similitud de estos resultados con los obtenidos en los animales PS1xAPP viejos, podemos proponer que el “fallo” en la acidificación de los lisosomas podría originar una acumulación de precursores del β -amiloide y del complejo γ -secretasa en vesículas autofágicas, sin que tenga lugar una degradación eficiente del contenido de las mismas.

4.5 Los sinaptosomas de los animales viejos PS1xAPP contienen A β monomérico y formas oligoméricas en baja concentración.

En el apartado 4.3 mostramos la acumulación de A β monomérico en los sinaptosomas (y posiblemente en vesículas autofágicas) de los animales PS1xAPP de 18 meses. La acumulación de A β a nivel intracelular supone un aliciente atractivo a la hora de intentar explicar la aparición de formas oligoméricas de A β . En este sentido, un aumento en la concentración intracelular de A β en vesículas (posiblemente autofágicas) sin que exista degradación podría promover la agregación del mismo en formas oligoméricas. Una mejor caracterización bioquímica de los péptidos de A β presentes en los sinaptosomas de los animales PS1xAPP podría apoyar o descartar esta hipótesis.

El estudio de los péptidos amiloideos en modelos animales se plantea como una tarea complicada, debido a las diferentes formas de agregación que presenta el β -amiloide *in vivo*. Así pues, en nuestro modelo animal PS1xAPP de 18 meses hemos encontrado hasta 3 formas diferentes de β -amiloide: el A β intracelular o sinaptosomal, las placas de β -amiloide extracelulares insolubles y las formas oligoméricas extracelulares solubles de A β presentes en todo el parénquima hipocampal (Jimenez et al, 2008). Con este escenario nuestro primer objetivo fue demostrar la procedencia intracelular de la carga amiloide encontrada en los sinaptosomas de 18 meses, descartando la posible contaminación con Abeta extracelular. Para ello preparamos dos aproximaciones distintas: la primera para descartar una posible contaminación de las fracciones sinaptosomales por placas de A β , y la segunda con la finalidad de descartar una posible contaminación por A β extracelular durante el proceso de homogeneización y formación de los sinaptosomas. Los resultados obtenidos de ambas aproximaciones se analizaron mediante WB en membranas de PVDF.

En el primer caso, se procesaron en paralelo dos hemicortezas del mismo animal de 12 meses PS1xAPP empleando el protocolo de fraccionamiento para obtener sinaptosomas de ratón (apartado 9.1; materiales y métodos). Una de las hemicortezas se homogeniza en tampón de homogenización, conteniendo 0.1% CHAPS-0.1% DOC. La adición de los detergentes evita la formación de sinaptosomas durante la homogenización de los tejidos. Tras la homogenización, se continuó con el protocolo normal y el extracto crudo mitocondrial se fraccionó en gradiente de ficoll PM400. De ambos gradientes tomamos 10 fracciones desde la parte superior y un pellet y analizamos la presencia de A β monomérico en todas ellas.

RESULTADOS

Como se muestra en la figura R37.A, tras el fraccionamiento del extracto crudo mitocondrial, los sinaptosomas, identificados por el marcador mitocondrial ATP-sintetasa- β , se observaron en la interfase de ficoll 13%-7%, correspondiente a las fracciones 6, 7 y 8 del gradiente, mientras que la parte del marcador mitocondrial correspondiente a las mitocondrias libres apareció en el pellet. El estudio del péptido A β monomérico en membranas de PVDF mostró un patrón muy semejante al descrito para el marcador mitocondrial. Una parte del β -amiloide se diferenció junto a los con los sinaptosomas en las mismas fracciones del gradiente (<10% del total), mientras la mayor parte del mismo permanece en el pellet (>90% del total). Por otra parte, en la figura R37.A (panel inferior) se muestra como la adición de detergentes abolió completamente este efecto. Estos resultados sugieren que el péptido A β que se observa en el pellet del gradiente corresponde a las placas extracelulares, mientras que la proporción de A β que muestra capacidad para flotar debe corresponder al vesiculado en sinaptosomas y no al procedente de las placas.

Mediante la segunda aproximación descartamos la posibilidad de que el péptido A β extracelular soluble pudiese contaminar nuestras preparaciones de sinaptosomas. Con esta finalidad, aislamos sinaptosomas partiendo de una hemicorteza de un animal WT de 6 meses. Al medio de homogenización isotónico le añadimos 500 ng/ml (500 μ g/mg proteína soluble) de A β monomérico sintético, concentración 3 órdenes de magnitud superior a la encontrada en las fracciones solubles S1 de los animales de 18 meses PS1xAPP según nuestros resultados de ELISA (ver figura R1.A). En la figura R37.B se muestra la detección de A β en sinaptosomas empleando membranas de PVDF. Junto con los sinaptosomas del animal WT de 6 meses control y el contaminado con A β soluble, también cargamos las muestras de sinaptosomas de animales PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses. Nuestros resultados mostraron que la adición al medio de A β soluble no se detecta en la fracción sinaptosomal. Por lo tanto, bajo estas condiciones experimentales no existe contaminación de sinaptosomas por A β extracelular soluble. Este resultado, junto con el anteriormente descrito para el β -amiloide de placas, demuestran que las formas de A β extracelulares solubles o insolubles no parecen contaminar nuestras preparaciones de sinaptosomas según la metodología empleada, por lo que el β -amiloide detectado en estas muestras debe ser de origen intracelular.

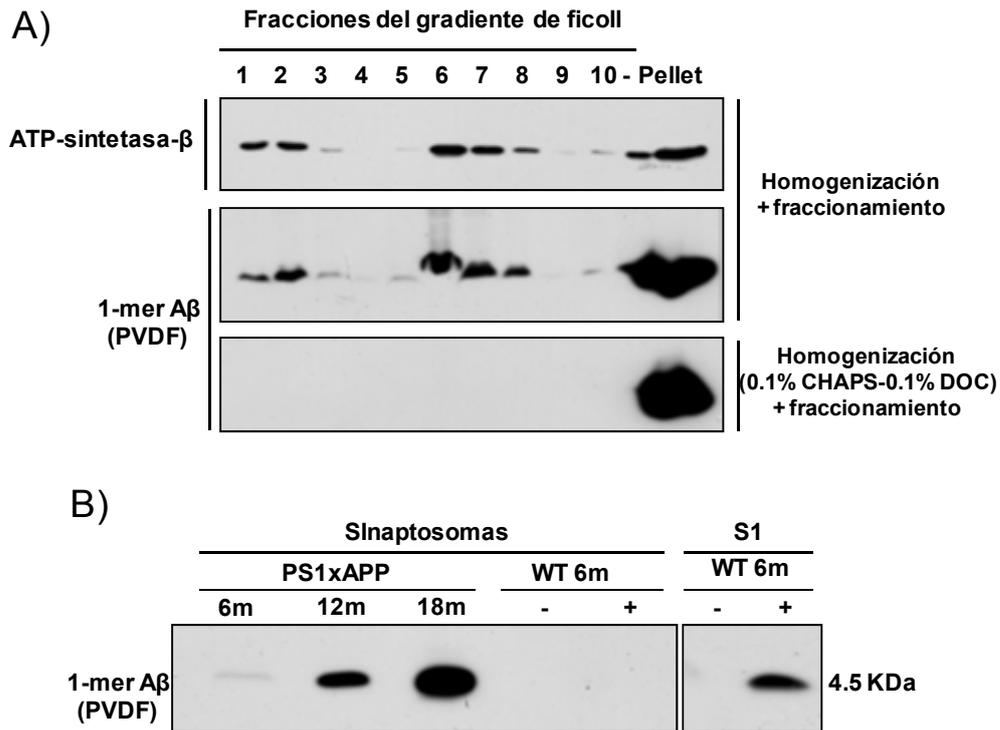


Figura R37. Estudio de la posible contaminación por A β extracelular en preparaciones de sinaptosomas.
 A) WB representativo para ATP-sintetasa- β y A β monomérico en membranas de PVDF tras aislamiento de sinaptosomas en gradiente de ficoll de un animal PS1xAPP de 12 meses. Frente a la condición estándar se ensaya una condición con bajas concentraciones de detergentes para evitar la formación de sinaptosomas. Bajo esta condición, todo el péptido A β se localiza en el fondo del gradiente y no muestra capacidad para flotar. B) WB representativo para A β monomérico en membranas de PVDF empleando sinaptosomas de animales PS1xAPP de 6, 12 y 18 meses y WT previamente contaminado o no con A β monomérico exógeno. El tampón de homogenización presenta una alta concentración de A β monomérico soluble como se muestra en el WB de las fracciones S1 de WT (panel derecho). Sin embargo este A β no contamina la preparación de sinaptosomas.

Nuestro siguiente paso consistió en caracterizar mejor el incremento de A β detectado entre 6 y 18 meses en sinaptosomas de animales PS1xAPP. Para ello, 3 animales diferentes se analizaron mediante WB en gel al 16%-poliacrilamida-SDS. Como se muestra en la figura R38.A, los 3 animales de 18 meses analizados mostraron una fuerte acumulación de A β monomérico en sinaptosomas con respecto a los animales jóvenes (detectado con el anticuerpo 6E10). La presencia de un extracto de proteínas de sinaptosomas de un animal WT puso de manifiesto la especificidad de las bandas correspondientes al péptido β -amiloide, a C99 y a APP-FL en los animales PS1xAPP. La cuantificación de las diferencias observadas entre 6 y 18 meses muestra que la cantidad de A β monomérico está aumentada en torno a 19 veces en los animales viejos respecto a los jóvenes (ver figura R38.B), sin que hayamos observado formas oligoméricas de A β bajo estas condiciones experimentales (ver figura R38.A y comparar con el panel adjunto). Este fuerte incremento en la concentración intracelular

RESULTADOS

de A β debería ser consecuencia no solamente de su acumulación sino también del aumento en la actividad β - y γ -secretasa que acontece en estos animales asociado a la edad.

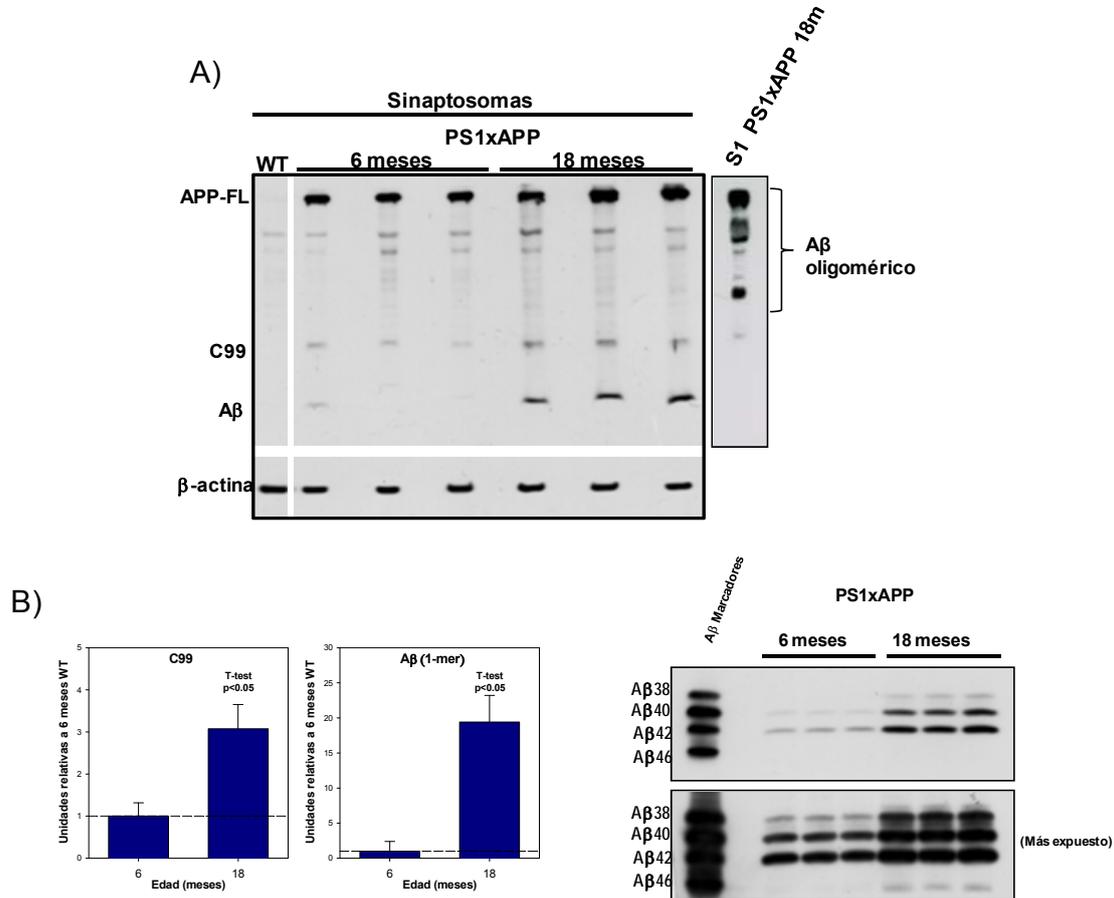


Figura R38. Estudio del péptido β -amiloide en sinaptosomas de corteza de animales PS1xAPP. A) WB representativo empleando el anticuerpo 6E10 en proteínas sinaptosomales de animales de 6 y 18 meses, incluyendo un control WT de 6 meses. No se observan formas oligoméricas de A β como en las fracciones S1 de estos mismos animales (comparar con panel anexo importado de la figura R2). B) Tanto A β monomérico como C99 se acumulan en sinaptosomas durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. C) WB representativo empleando el anticuerpo 82E1 tras electroforesis en gel de SDS-urea. Las isoformas predominantes detectadas fueron A β 42 y A β 40, sin que haya diferencias significativas en la razón 42/40 (~4:1) durante el envejecimiento. T-test p<0.05, cambios estadísticamente significativos con respecto a 6 meses.

A la luz de los recientes resultados que ponen manifiesto la importancia de la razón A β 42/A β 40 en la formación de especies oligoméricas de A β neurotóxicas (Kuperstein et al., 2010), decidimos abordar ensayos que nos permitieran conocer esta razón y como cambia con la edad de los animales estudiados. Para estos ensayos, sometimos las mismas muestras de sinaptosomas de 6 y 18 meses a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS-UREA. El estudio del β -amiloide mediante esta técnica mostró que en los sinaptosomas de los animales PS1xAPP la forma de A β 42 es la

más abundante con respecto a las demás (figura R38.C). La proporción calculada de A β 42/A β 40 en nuestros animales corresponde a 3.96 ± 0.63 (n=3) sin que hayamos encontrado diferencias asociadas a la edad. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la proporción de A β 42 intracelular es significativamente superior a la de A β -40. Si bien, esta razón A β 42/40 podría influir en la formación de especies oligoméricas, en nuestros animales de 6 meses la presencia de oligómeros es muy baja (ver apartado 1 de resultados). Por lo tanto, en nuestros animales el factor decisivo que promueva el aumento en la concentración de formas oligoméricas solubles debe ser la acumulación de A β intracelular más que la razón A β 42/40, aunque muy posiblemente sin una razón A β 42/40 elevada los oligómeros de A β no se formarían (Kuperstein et al., 2010).

Por otro lado, aunque nuestra hipótesis de partida supone que la oligomerización del péptido β -amiloide debe tener un origen intracelular, hemos sido incapaces de detectar oligómeros mediante WB en los sinaptosomas de los animales viejos PS1xAPP. Para profundizar mejor en esta cuestión, decidimos abordar ensayos de inmunoprecipitación (IP). Para estos ensayos procedimos de forma idéntica a lo descrito en el apartado 1 de resultados para la inmunoprecipitación a partir de las fracciones S1 de los animales PS1xAPP. Previamente, hemos comprobado que la proporción de proteínas solubles en sinaptosomas es aproximadamente de un 50%, por lo que para conseguir que los resultados obtenidos fueran comparables con los obtenidos en las fracciones S1, partimos de una cantidad doble de proteína (100 μ g) de la empleada en el apartado 1 de resultados (50 μ g).

En el caso de los sinaptosomas, las muestras (un pool de 3 animales) se sonicaron al menos 3 veces para liberar el contenido de proteínas solubles y seguidamente se precipitó el contenido de membranas por centrifugación. El sobrenadante obtenido es el punto de partida para llevar a cabo la inmunoprecipitación con el anticuerpo A11 (Kayed et al., 2007). Tras la inmunoprecipitación con este anticuerpo, los precipitados se sometieron a electroforesis en geles al 12%-poliacrilamida-SDS y se analizaron mediante WB. En la figura R39.A se muestra la inmunoprecipitación previamente mostrada en el apartado 1 de resultados junto con el resultado obtenido a partir de los sinaptosomas de 6 y 18 meses de animales PS1xAPP. De estos resultados podemos concluir que existen formas oligoméricas de A β en los sinaptosomas de los animales de 18 meses PS1xAPP, aunque la presencia fue mucho menor a la detectada en la fracción S1 de estos mismos animales. Además, los oligómeros de A β inmunoprecipitados por el anticuerpo A11 apenas se apreciaron

RESULTADOS

en los sinaptosomas de los animales jóvenes (ver figura R39.A) lo que demuestra que se acumulan durante el envejecimiento. En este sentido, parece ser que las formas precipitadas con A11 a partir de sinaptosomas presentan gran similitud con las previamente observadas en las fracciones S1. De hecho, conseguimos precipitar todas las formas presentes en las fracciones S1 excepto aquella de 24 KDa. Este resultado sugiere que las formas oligoméricas presentes en el medio extracelular podrían ser de origen neuronal.

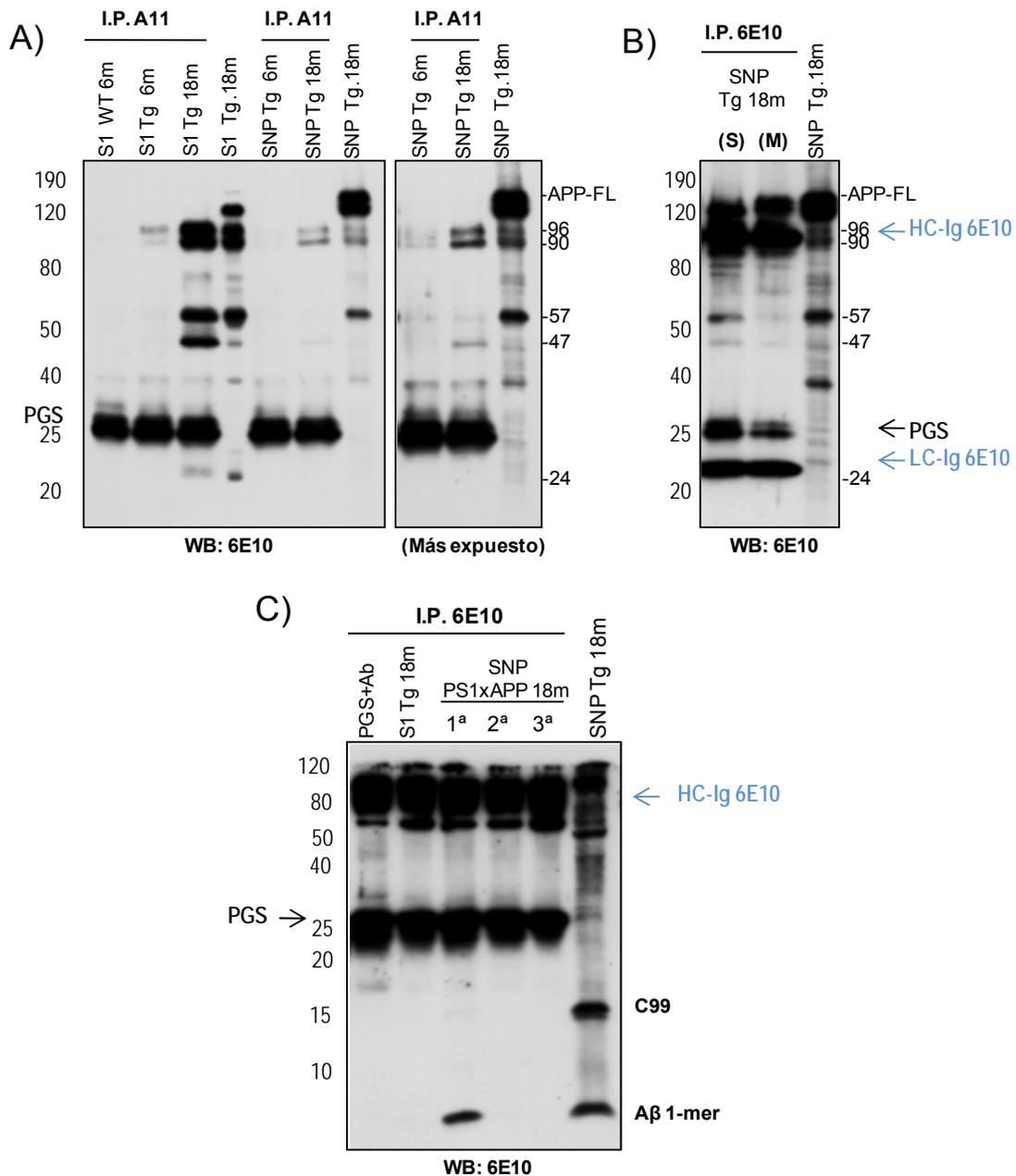


Figura R39. Inmunoprecipitación de formas oligoméricas de A β contenidas en sinaptosomas en animales PS1xAPP. A) WB representativo muestra los oligómeros de A β inmunoprecipitados por el anticuerpo A11 a partir de fracciones S1 y sinaptosomas de animales de 6 y 18 meses en gel al 12 % poliacrilamida-SDS. Aparentemente las mismas formas oligoméricas se reconocieron en ambas muestras aunque la concentración en sinaptosomas es mucho menor a la presente en S1 de los animales de 18 meses. B) WB representativo de los oligómeros precipitados con 6E10 a partir de la fracción soluble o de membranas de los sinaptosomas de animales de 18 meses. Los oligómeros de 57 y 47 KDa se observan principalmente en la parte soluble y mínimamente en membranas. C) WB representativo de los oligómeros precipitados por 6E10 a partir de S1 y sinaptosomas de animales de 18 meses (3 precipitaciones seriadas). El estudio en gel al 16% poliacrilamida-SDS muestra A β monomérico exclusivamente en sinaptosomas y no en S1. No hemos detectado otros oligómeros de bajo peso molecular.

Experimentos adicionales empleando el anticuerpo 6E10 tanto en IP como en WB mostraron que estas formas oligoméricas son también reconocidas por 6E10 (figura R39.B). En la IP con 6E10 no solamente analizamos la presencia de formas oligoméricas en la parte de proteínas solubles (S), sino también en la de membranas (M). Para ello, el pellet de membranas obtenido por centrifugación se solubilizó en 1% CHAPS-1% DOC (ver materiales y métodos; apartado 15). El estudio de las formas oligoméricas empleando 6E10 en IP mostró que este anticuerpo reconoció las mismas formas que A11 en los sinaptosomas y que estas especies se encontraron preferentemente en la parte soluble de los sinaptosomas (S). Este resultado de nuevo pone de manifiesto la similitud entre las formas oligoméricas inmunoprecipitadas de las fracciones solubles y de los sinaptosomas de los animales PS1xAPP. Al igual que habíamos descrito en el apartado 1 de resultados, la interferencia de la banda correspondiente a la cadena pesada de 6E10 no nos permitió observar las formas oligoméricas correspondientes a 90 y 96 KDa.

Finalmente, los precipitados obtenidos mediante 3 inmunoprecipitaciones seriadas con 6E10 a partir de sinaptosomas de 18 meses se analizaron en gel al 16%-poliacrilamida-SDS. Como esperábamos, apareció gran cantidad de β -amiloide monomérico en la primera precipitación seriada (ver figura R39.C) mientras que no se observó A β monomérico cuando la inmunoprecipitación partió de la fracción S1 de 18 meses. Estos resultados demuestran que no existen oligómeros de bajo peso molecular como di-, tri- o tetrámeros (~9; ~13.5 y ~18KDa respectivamente) inmunoprecipitados por 6E10 en muestras de sinaptosomas de 18 meses. Desafortunadamente, los oligómeros de alto peso molecular previamente mostrados en la figura R39.A y R39.B no se observaron debido a la interferencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina de 6E10. Como ya mostrábamos en el primer apartado de resultados, el uso de este anticuerpo en IP y WB dio lugar a ruido de fondo entre 50 y 120 KDa lo que no nos permitió observar nada más en este rango de Mr.

RESULTADOS

Los resultados mostrados en este apartado sugieren que las formas oligoméricas encontradas en el medio extracelular de los animales PS1xAPP de 18 meses podrían ser de origen intracelular, y posiblemente procedente de las terminales sinápticas. Sin embargo, la principal forma de A β sinaptosomal es la monomérica, y ésta no se observa en las fracciones solubles S1 de los animales de 18 meses PS1xAPP. Este hecho sugiere que enzimas como neprelisina (NEP) o la enzima que degrada insulina (IDE) son capaces de degradar esta forma de A β en el medio extracelular, no siendo tan eficientes en la degradación de las formas oligoméricas (Walsh et al., 2002).

5. Estudio del péptido A β presente en los depósitos extracelulares de A β como posible fuente de oligómeros solubles en los animales PS1xAPP.

Hasta este momento, este trabajo se ha centrado en investigar los posibles mecanismos implicados en el aumento de la producción de A β intracelular como principal causa de la oligomerización de estos péptidos. Sin embargo, otras causas también podrían ser posibles, como las propias placas del β -amiloide. En este sentido, cabe la posibilidad de que las placas se vuelvan más lábiles durante el envejecimiento y que ello tenga como consecuencia la liberación de formas oligoméricas de A β al medio extracelular. Esta hipótesis se basa en el aumento de tamaño y cambio morfológico que se produce en las placas de A β durante el envejecimiento de nuestro modelo (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009, resultados no publicados).

Para evaluar esta hipótesis en nuestro modelo PS1xAPP, hemos empleado el método de solubilización secuencial mostrado en el apartado 3 de resultados con algunas modificaciones. En este caso, obviamos la precipitación de núcleos y células sin romper, para evitar la pérdida de placas. El precipitado obtenido mediante centrifugación a alta velocidad (100.000 xg) se sonica en tampón isotónico, para favorecer la liberación del contenido soluble vesiculado. Tras una nueva centrifugación, se lava el precipitado obteniéndose así la muestra de partida para la solubilización secuencial. Presumiblemente, el precipitado debería ser rico en placas de β -amiloide y pobre A β soluble.

En la figura R40 se muestran los resultados obtenidos siguiendo este método y ensayando la presencia del péptido A β mediante WB con el anticuerpo 6E10. En primer lugar, se observa la acumulación de C99 en la fracción de proteínas resistente

a CHAPS como ya habíamos mostrado en el apartado 3 de resultados. En segundo lugar, el estudio del péptido β -amiloide acumulado en placas muestra principalmente formas monoméricas en todas las edades estudiadas. Sin embargo, durante el envejecimiento, la acumulación de oligómeros de alto peso molecular se va haciendo cada vez mayor, llegando a alcanzar niveles similares a los de $A\beta$ monomérico en los animales de 18 meses (ver figura R40.A). Como esperábamos, la mayor parte del péptido β -amiloide se concentra en la tercera fracción solubilizada (3ª Solub.: SDS 2%), lo que demuestra la resistencia de las placas a la solubilización. En esta fracción encontramos un fuerte incremento tanto en las formas monoméricas y diméricas, como en oligómeros de alto peso molecular durante el envejecimiento de los animales (figura R40.B). De hecho, en los animales de 18 meses, la mayor parte de los oligómeros de alto peso molecular se concentran en esta fracción (3ª Solub.: SDS 2%). La segunda fracción (2ª Solub.: CHAPS 1%-DOC 1%-SDS 2%) muestra también un fuerte aumento en las formas oligoméricas de $A\beta$, aunque de menor grado que la encontrada en la 3ª Solub. En este sentido, puesto que la solubilización de $A\beta$ en esta fracción se realiza con una mezcla menos agresiva que el SDS por sí mismo, podemos postular que el péptido $A\beta$ extraído bajo estas condiciones podría proceder una región más lábil de las placas (posiblemente de la periferia).

RESULTADOS

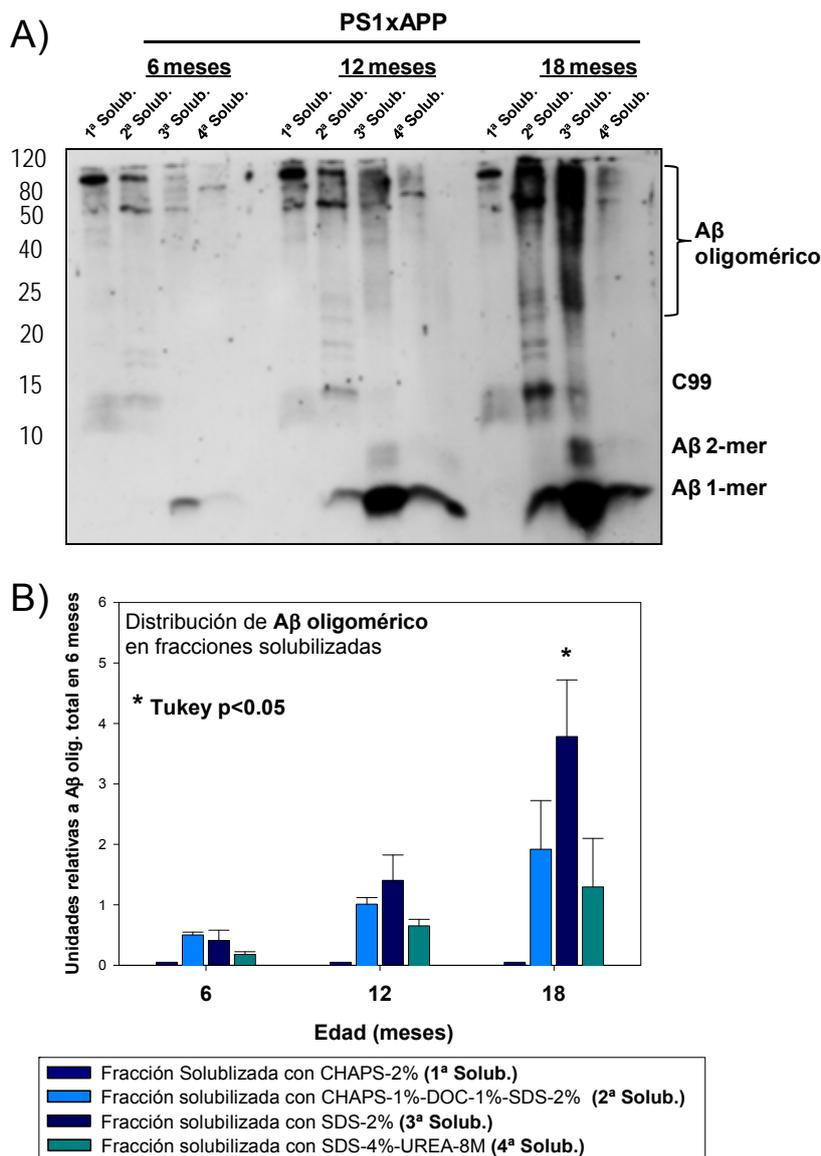


Figura R40. Presencia de formas oligoméricas de alto peso molecular en placas de Aβ. A) WB representativo de las formas de Aβ detectadas en las fracciones obtenidas mediante solubilización secuencial de los depósitos de Aβ (placas extracelulares) que presenta nuestro modelo a los 6, 12 y 18 meses. B) La mayor concentración de Aβ (tanto monómeros como oligómeros) se concentra en la fracción solubilizada con SDS, indicando resistencia del Aβ fibrilar a la solubilización. Una parte de la carga total de Aβ (tanto monómeros como oligómeros) se solubiliza por la mezcla de CHAPS-DOC-SDS, y experimenta un aumento similar al que se observa en la fracción solubilizada por SDS, durante el envejecimiento. La parte solubilizada con esta mezcla (más suave que SDS) podría corresponder a la parte de Aβ más lábilmemente unida a las placas. (*): Tukey p<0.05, cambios estadísticamente significativos con respecto a la misma fracción en 6 meses.

En este sentido, si asumimos que el grado de solubilización en una batería de detergentes como la que empleamos en este trabajo, puede ser un ser un reflejo de la labilidad de las placas a la hora de liberar formas oligoméricas al medio, podemos sugerir que la fracción de Aβ que se solubiliza más fácilmente podría representar el péptido Aβ presente en partes de la placa más lábilmemente unida a las placas y que podrían liberarse durante

el envejecimiento de los animales, lo que podría contribuir al aumento en formas solubles de A β detectada en las fracciones S1 de nuestros animales viejos. Sin embargo, debido a la ausencia de controles válidos para determinar el efecto de la homogeneización, sonicación y/o centrifugación sobre la liberación de oligómeros de las placas, no podemos descartar su posible contribución en los oligómeros presentes en las fracciones S1. Aunque esta posibilidad es aparentemente poco probable ya que el β -amiloide monomérico es tan abundante, o más, que el oligomérico en las placas (ver figura R40.A), y sin embargo, éste no se ha detectado en las fracciones S1.

RESULTADOS

F. DISCUSIÓN

1. Efecto neurotóxico de las formas oligoméricas solubles del péptido A β

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo caracterizado principalmente por la pérdida sináptica, la aparición a nivel intracelular de depósitos insolubles de la proteína tau hiperfosforilada, a nivel extracelular de A β , y la muerte neuronal. Clásicamente, y desde hace ya más de una década, se ha atribuido a la acumulación de los péptidos A β las principales alteraciones moleculares y celulares implicadas en el progreso de esta enfermedad (Haass and Selkoe, 2007). Sin embargo, los depósitos de A β en forma de placas guardan una relación muy pobre con la pérdida sináptica, la muerte neuronal y las deficiencias cognitivas asociadas a este desorden neurológico (Kuo et al., 1996; Lue et al., 1999; Chatelat et al., 2011). Nuestro modelo transgénico PS1_{M146L}XAPP_{751-SL} es un claro ejemplo ya que presenta deposición temprana de placas, a partir de los 3 meses de edad (Blanchard et al., 2003) y sin embargo no tiene degeneración de las neuronas principales hipocampales hasta los 18 meses (Schmitz et al., 2004; Jimenez et al., 2008).

Estudios más recientes han puesto de manifiesto la fuerte correlación que existe entre las formas solubles oligoméricas de A β , las deficiencias cognitivas, y la pérdida sináptica y neuronal asociadas a esta patología (Townsend et al., 2006; Knobloch et al., 2007; Shankar, 2007; Lesne et al., 2006; Hsieh, 2006; Lacor et al., 2004; Lacor et al., 2007; Wei et al., 2010; Deshpande et al., 2006). De hecho, formas solubles oligoméricas de A β , obtenidas a partir del cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer o de modelos transgénicos, han mostrado capacidad para interrumpir los procesos de potenciación a largo plazo (LTP), aprendizaje y memoria en animales sanos (Shankar et al., 2008; Lesne et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que los oligómeros de A β median el desarrollo de estas alteraciones patológicas permanecen aún desconocidos en gran medida, y actualmente son objeto de numerosas investigaciones. En lo que respecta a la pérdida sináptica, se han descrito las formas oligoméricas de A β como ligandos para varios receptores post-sinápticos como los receptores ionotrópicos de NMDA y AMPA o los metabotrópicos de glutamato mGluR. La unión de los oligómeros de A β a estos receptores en la terminal postsináptica origina su endocitosis y, por tanto la inhibición en la transmisión sináptica mediada por glutamato (Snyder et al., 2005; Hsieh, 2006), lo que finalmente puede incurrir en la degeneración sináptica (Maletic-Savatic et al., 1999; Matsuzaki et al., 2004; Zhou et al., 2004).

Por otra parte, la unión de los oligómeros de A β como agonistas a receptores ionotrópicos de NMDA y AMPA también puede mediar la muerte neuronal por

DISCUSIÓN

mecanismos de excitotoxicidad, al producir un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Selkoe, 2001; Resende et al., 2007; Alberdi et al., 2010; Texido et al., 2011). Los péptidos $\text{A}\beta$ también pueden actuar como agonistas sobre otros receptores como el receptor de neurotrofinas p75, implicado en la muerte de las neuronas colinérgicas del encéfalo basal mediada por $\text{A}\beta$ (Sotthibundhu et al., 2008). En este sentido, ya sea por el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} mediada por los receptores de NMDA/AMPA, o por la activación de otros receptores de membrana como p75NTR, los oligómeros de $\text{A}\beta$ podrían inducir la fosforilación de JNK (c-jun quinasa), que participa en la formación del apoptosoma y la transcripción de la caspasa-3 efectora, lo que finalmente terminaría en la apoptosis celular (Coulson, 2006; Di et al., 2010).

Del mismo modo, estas formas de $\text{A}\beta$ también pueden actuar sobre las células gliales, induciendo la producción de factores proinflamatorios y citotóxicos como el factor de necrosis tumoral $\text{TNF}\alpha$ (White et al., 2005; Chen and Lipton, 2006; Floden and Combs, 2006; Jiao et al., 2008), que puede promover la muerte celular actuando sobre receptores de muerte (MacFarlane M and Williams AC., 2004), o incrementando la excitotoxicidad mediada por los oligómeros de $\text{A}\beta$ a través de receptores AMPA (Pickering et al., 2005; Stellwagen et al., 2005). Coincidiendo con estas evidencias, nuestro grupo ha descrito el efecto de los oligómeros solubles de $\text{A}\beta$ sobre las células de la microglía. En este sentido, el fuerte incremento en formas oligoméricas de $\text{A}\beta$ solubles a nivel extracelular que tiene lugar en los animales PS1xAPP de 18 meses es responsable de la activación de la microglía hacia un fenotipo clásico, caracterizado por la producción de $\text{TNF}\alpha$, FASL y TRAIL, coincidiendo con la pérdida de neuronas principales hipocampales que acontece en nuestros animales viejos (Jimenez et al., 2008). Además en este trabajo también mostramos una activación de la microglía asociada a los depósitos de $\text{A}\beta$ fibrilar, con un fenotipo alternativo opuesto al clásico. Esta diferenciación alternativa acompaña a las placas desde edades tempranas y se caracteriza por la expresión del marcador de macrófagos YM1 (Edwards et al., 2006). Una reacción inflamatoria, como la mostrada por las células que manifiestan un fenotipo alternativo, podría explicar al menos en parte, la falta de concordancia que existe entre la acumulación de $\text{A}\beta$ fibrilar y la ausencia de neurodegeneración a edades tempranas en nuestro modelo, así como en otros empleados en el estudio de esta patología.

Las evidencias que ponen de manifiesto el efecto neurotóxico de las formas oligoméricas de $\text{A}\beta$ son muy abundantes en la literatura, ya sea actuando directamente

sobre las neuronas o a través de las células gliales. Sin embargo, estas especies de A β también pueden unirse a receptores de membrana, como antagonistas, bloqueando la señalización intracelular necesaria para la supervivencia celular. Un ejemplo claro de esta acción es la unión de los oligómeros del péptido A β a receptores de insulina (Xie et al., 2002; Zhao et al., 2008; Zhao et al., 2009). En este sentido, tanto el péptido β -amiloide como la insulina muestran un alto grado de homología en algunos dominios de su estructura terciaria (Turnell and Finch, 1992), lo que además determina que ambos sean sustratos de la enzima implicada en la degradación de insulina (IDE) (Kurochkin, 1998). Esto podría explicar la afinidad del péptido β -amiloide por unirse a estos receptores. En este contexto, las deficiencias en la señalización mediada por los receptores de insulina e IGF-1 han sido asociadas al desarrollo de la AD (Cole and Frautschy, 2001). Además, el bloqueo producido por los péptidos A β de la señalización mediada por insulina, podría estar implicado en la resistencia a insulina que se ha asociado al desarrollo de la AD (Moloney et al., 2010), y apoyaría las evidencias que sustentan que la AD podría ser clasificada como una diabetes tipo III (Hoyer, 1998; Eric et al., 2005).

Coincidiendo con estas evidencias, en este trabajo hemos mostrado in vitro: i) el efecto agonista que presenta el péptido sAPP α sobre los receptores de, al menos, insulina e IGF-1, activando la vía pro-supervivencia PI3K-AKT-GSK-3 β ; y ii) el efecto antagonista de los oligómeros de A β sobre esta vía, interrumpiendo la señalización pro-supervivencia mediada por neurotrofinas (incluido sAPP α) (Townsend et al., 2007). En este sentido, nuestros animales PS1xAPP jóvenes mostraron un fuerte incremento en la fosforilación de GSK-3 β , coincidiendo con la alta concentración de sAPP α y la escasa muerte neuronal observada en estos animales. Sin embargo, los animales PS1xAPP viejos mostraron un descenso significativo en la fosforilación de GSK-3 β con respecto a los WT, coincidiendo con un fuerte incremento en la concentración formas oligoméricas de A β asociado a la edad y a la muerte de neuronas principales hipocampales. Dado el papel central que juega GSK-3 β en el desarrollo de la AD (Balaraman et al., 2006), el estado de neuroprotección que muestran los animales jóvenes podría estar mediado en parte por la inhibición de GSK-3 β , mientras en los animales viejos el incremento en la actividad de esta quinasa estaría contribuyendo al estado de neurodegeneración.

Con respecto al posible papel neuroprotector de APP α soluble, es destacable que la activación de los receptores de insulina e IGF-1 mediada por este péptido se produce a concentraciones relativamente bajas (rango nM) (Jimenez et al., 2011).

DISCUSIÓN

Como consecuencia de la activación de la vía PI3K/AKT, el efecto del péptido sAPP α sobre la fosforilación de GSK-3 β *in vitro* sugiere que la inhibición de GSK-3 β , observada en los animales jóvenes PS1xAPP, puede producir un incremento en la expresión del factor anti-apoptótico bcl-2 (Jimenez et al., 2011; Karlinski et al., 2007). Estos efectos podrían explicar el estado de neuroprotección aparente de los animales PS1xAPP durante la mayor parte de su vida, aun presentando gran número de placas del β -amiloide desde edades tempranas (Blanchard et al., 2003). Por otra parte, en este modelo al igual que en muchos otros similares, la alta concentración de sAPP α debe ser consecuencia de la sobre-expresión de la proteína APP humana transgénica. Por lo tanto, los resultados mostrados en este trabajo podrían explicar, al menos en parte, por qué la mayoría de los modelos animales utilizados en el estudio de la AD no muestran ni hiperfosforilación de la proteína tau ni la fuerte pérdida neuronal que acompaña a la enfermedad; o bien, por qué la presentan exclusivamente en edades avanzadas (Wong et al., 2002). Sin embargo, no todos los modelos presentan un aumento en la fosforilación de GSK-3 β (Masliah et al., 1997; Malm et al., 2007), posiblemente en algunos casos debido a la baja expresión del transgén APP, aunque no podemos descartar que otros mecanismos moleculares puedan mediar este efecto neuroprotector. En consecuencia, este aparente efecto neuroprotector debe ser inherente a la sobre-expresión de la proteína precursora de A β que, por otra parte, es necesaria para que tenga lugar la producción de péptidos A β y la aparición de placas en la mayor parte de los modelos animales utilizados para el estudio de la enfermedad.

Otros factores solubles presentes en el medio extracelular como IGF-1, insulina, otras neurotrofinas, e incluso el péptido A β monomérico (Giuffrida et al., 2009) podrían participar en este efecto neuroprotector. Sin embargo, no hemos detectado A β monomérico extracelular soluble en los animales jóvenes PS1xAPP y nuestros resultados en cultivos de células N2a muestran una reversión prácticamente total sobre la fosforilación de GSK-3 β tras la depleción de sAPP α del medio de estimulación. Esto implica que sAPP α debe ser el principal factor implicado en este efecto sobre la fosforilación de GSK-3 β , si no el único.

En conclusión, el incremento en la fosforilación de GSK-3 β , junto con la respuesta inflamatoria neuroprotectora asociada al fenotipo alternativo de la glía podrían justificar la escasa pérdida neuronal observada en nuestro modelo PS1xAPP en las edades más tempranas. En este sentido, estrategias terapéuticas basadas en

estas evidencias podrían constituir posibles tratamientos efectivos para frenar la neurodegeneración de la AD (Kojro et al., 2006; Copanaki et al., 2010).

El efecto antagonista de las formas oligoméricas de A β sobre la vía PI3K-AKT-GSK-3 β resulta más interesante en lo que respecta a la AD. Aunque los datos presentados en este trabajo no demuestran una asociación directa entre los oligómeros de A β y la inhibición de la fosforilación de GSK-3 β *in vivo*, de los *datos in vitro* podemos postular que el incremento en la concentración de A β oligomérico debe ser responsable del bloqueo de esta vía de señalización en los animales de 18 meses. En estos animales, la disminución en la fosforilación de GSK-3 β debe traducirse en un incremento en la actividad quinasa de esta enzima como sugiere el incremento en la razón fosfo/total β -catenina con respecto a los animales jóvenes, que conlleva su degradación (Liu et al., 2002), así como el aumento en la fosforilación de tau en epítomos reconocidos por los anticuerpos AT8 y AT100 (Zheng-Fischhofer et al., 1998). En congruencia con un aumento en la actividad enzimática de GSK-3 β , también hemos encontrado un aumento en la expresión de los factores pro-apoptóticos Bim y Bad en los animales viejos (Jiménez et al., 2011). La expresión de estas proteínas se encuentra ligada a la actividad de GSK-3 β y regula la vía intrínseca de la apoptosis (Scali et al., 2006; Hongisto et al., 2003; Lonze and Ginty, 2002). Por lo tanto, los resultados mostrados en este trabajo sugieren que el efecto antagonista de los oligómeros de A β sobre la señalización de la vía PI3K-AKT-GSK-3 β puede llevar a la muerte celular mediada por apoptosis.

El efecto antagonista de los oligómeros de A β sobre los receptores de membrana que activan la vía PI3K-AKT-GSK-3 β está apoyado por la inhibición de la fosforilación de GSK-3 β mediada por NGF y BDNF, lo que sugiere que los oligómeros pueden bloquear la vía PI3K-AKT-GSK-3 β uniéndose no solo a receptores de insulina o IGF-1, sino también a TrkA y TrkB (Jimenez et al., 2011). Este mecanismo podría explicar por qué se produce un descenso en la señalización trófica mediada por NGF durante el desarrollo de la AD (Capsoni et al., 2002; Capsoni et al., 2010; Houeland et al., 2010). Además, el efecto de los oligómeros de A β sobre la señalización de esta vía también puede estar mediado por su unión a otros receptores de membrana como p75NTR o NMDA (Decker et al., 2010; Knowles et al., 2009). La activación de estos receptores por los oligómeros de A β puede inducir la activación de JNK quinasa (Coulson, 2006), lo que podría interrumpir la señalización mediada por los receptores de insulina en otros puntos de la cascada de señalización (Ma et al., 2009). Este

DISCUSIÓN

mecanismo también podría justificar la vulnerabilidad de las neuronas del sistema colinérgico en los enfermos de AD (Sotthibundhu et al., 2008).

Coincidiendo con el bloqueo de la vía pro-supervivencia PI3K-AKT-GSK-3 β , el incremento en la concentración de formas oligoméricas solubles de A β en el espacio extracelular también induce una respuesta inflamatoria citotóxica asociada al fenotipo clásico de las células microgliales. Por lo tanto, a parte de las evidencias bibliográficas que muestran el papel neurotóxico de estas formas de A β , en este trabajo mostramos además su relación con otros mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal. En consecuencia, los oligómeros de A β parecen ser agentes causantes de la neurodegeneración propia de la AD, y deberían ser tenidos en cuenta a la hora de desarrollar alternativas terapéuticas contra esta enfermedad.

2. Caracterización de las formas solubles de A β oligomérico en el modelo PS1_{M146L}xAPP_{751-SL}.

En el desarrollo de este trabajo hemos denominado formas solubles de A β (ó ADDLs) a todas aquellas que se mantienen en solución tras centrifugación a 100.000 g en medio acuoso. Estas especies normalmente contienen desde 2- hasta 24- unidades (entre 8 y 100 KDa aproximadamente) (Glabe, 2008), aunque también se han aislado oligómeros de mayor peso molecular, 150-700 KDa, en pacientes con la enfermedad (ASPD: *amylospheroids*) (Noguchi et al., 2009).

Nuestros resultados muestran la presencia de formas oligoméricas solubles de distintos pesos moleculares (24, 47, 57, 90, 96 KDa) que, a priori, podrían clasificarse como oligómeros de 6, 10, 12, 20 y 22-mer resistentes a SDS en la fracción de proteínas solubles (S1) de los animales viejos PS1xAPP. La identidad de estos oligómeros ha sido confirmada utilizando el anticuerpo A11 (sólo reconoce oligómeros de relativamente alto peso molecular (Kayed et al., 2007) en ensayos de inmunoprecipitación, seguidos de WB empleando 6E10. Además, teniendo en cuenta la metodología empleada para su aislamiento, podemos suponer que la mayor parte del péptido A β identificado en estas muestras debe estar localizado extracelularmente. En este sentido, oligómeros de A β similares a los mostrados en este trabajo, y más concretamente hexámeros, nonámeros y dodecámeros (A β *56) también se han mostrado previamente en los extractos de proteínas solubles obtenidos de animales transgénicos y de enfermos de AD (Gong et al., 2003; Lesne et al., 2006; Cheng et al., 2007; Sherman and Lesne, 2011). Por el contrario, bajo nuestras condiciones experimentales no hemos conseguido detectar A β monomérico u oligómeros de bajo

peso molecular (dímeros, trímeros o tetrameros) en nuestros extractos de proteínas solubles (S1) mediante WB, ni siquiera empleando inmunoprecipitación con 6E10.

El hecho de que los oligómeros de A β presentes en las muestras S1 migren en gel desnaturante (SDS-PAGE) sin que aparezcan monómeros u oligómeros de bajo peso molecular, demuestra la resistencia de estas formas oligoméricas al detergente SDS (Rangachari et al., 2007). De modo similar, la presencia de oligómeros de A β resistentes a SDS, a urea y ácido fórmico ha sido previamente descrita en pacientes de AD (Kuo et al., 1996; Roher et al., 1996). Estas evidencias sugieren que los oligómeros de A β presentes en los enfermos de AD y en modelos como el nuestro podrían presentar enlaces covalentes, lo que justificaría su estabilidad en medios desnaturantes. En este sentido, se ha propuesto que la oxidación mediada por cobre de los residuos de tirosina e histidina de los péptidos A β puede promover la unión covalente de los péptidos A β entre sí (Atwood et al., 2003). En los enfermos de AD, la concentración de iones Cu²⁺ y el estrés oxidativo están incrementados (Squitti R et al., 2004; Zhu et al., 2005), y por lo tanto, estos enfermos presentan un microambiente celular propicio para que tenga lugar la estabilización de las formas oligoméricas mediante unión covalente de los péptidos A β . En nuestro modelo, no hemos evaluado directamente el daño oxidativo o la concentración de iones de cobre. Sin embargo, a juzgar por los cambios en la fosforilación de GSK-3 β que hemos descrito en los animales viejos PS1xAPP, también es posible que exista un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno durante el envejecimiento (Valerio et al., 2011). En este sentido, el posible estrés oxidativo en nuestros animales viejos también podría mediar la estabilización de los oligómeros de A β mediante la formación de enlaces covalentes entre los péptidos agregados, lo que justificaría la resistencia a SDS. Esta hipótesis está apoyada por evidencias recientes que muestran cómo el tratamiento con clioquinol (quelante de metales) reduce la concentración efectiva de iones metálicos y la agregación de A β en forma de placas en un modelo de la enfermedad similar al nuestro (Grossi et al., 2009). Esta evidencia sugiere que los metales, como el Cu²⁺, juegan un papel en la estabilización de los agregados de A β . Además, este trabajo también muestra una mejora en los déficits cognitivos de los animales tratados, lo que indica que la reducción en la agregación también debe producirse a nivel de los oligómeros solubles, y no sólo de las placas, ya que son estos los que guardan mejor relación con las alteraciones cognitivas (discutido en el apartado anterior).

DISCUSIÓN

Por otra parte, nuestros animales muestran, al menos a nivel intracelular, una proporción aproximada de A β 42:A β 40 de 4:1 en congruencia con la presencia de las mutaciones en APP (*London*) y PS1 (M146L) localizadas en el dominio donde tiene lugar el procesamiento γ -secretasa (Xia, 1997; Bentahir et al., 2006; Tan et al., 2008). En este sentido, se ha descrito que A β 42, a diferencia de A β 40, oligomeriza mayoritariamente en forma de hexámeros y pentámeros como estructuras más estables, a partir de las cuales se forman los agregados de mayor tamaño (Bitan et al., 2003; Bernstein et al., 2005). Coincidiendo con esta evidencia, la forma oligomérica de menor peso molecular detectada mediante WB en nuestras muestras de proteínas solubles corresponde a un oligómero de 24 KDa, que coincide con un hexámero. Por lo tanto, los hexámeros podrían ser en nuestro modelo las estructuras básicas para la formación de agregados mayores. Como ya hemos mencionado anteriormente, los agregados de A β solubles encontrados en nuestras muestras serían compatibles con oligómeros de 10, 12, 20 y 22-mer. Según este modelo, los oligómeros de 12-mer y 24-mer podrían ser el resultado de la asociación de 2 o 4 hexámeros respectivamente (Bernstein et al., 2009). Sin embargo, en el caso de los oligómeros de 10-mer o 20-mer no podríamos explicarlo de este modo puesto que en estas muestras no hemos encontrado aparentemente ningún oligómero compatible con un pentámero (de acuerdo con la movilidad relativa calculada tras electroforesis). En este sentido, es posible que las formas oligoméricas 10- y 20-mer puedan corresponder realmente a oligómeros 12- y 22-mer que podrían presentar mayor movilidad relativa. Para explicar este cambio en la movilidad relativa dentro del mismo oligómero podríamos atender a un aumento en la proporción de A β 40 presente o en las formas truncadas en el extremo N- terminal de A β 42 (Bitan et al., 2003), o bien a diferentes conformaciones adquiridas dentro del propio oligómero en función de los péptidos que lo componen (Zheng et al., 2008).

Actualmente existe mucha discrepancia a la hora de describir las formas oligoméricas solubles de A β aisladas a partir de tejidos de modelos de la enfermedad o de los propios enfermos. Un ejemplo de esta discrepancia se presenta en los resultados mostrados en este y otros trabajos (Gong et al., 2003; Lesne et al., 2006), frente a los mostrados por Selkoe y colaboradores. Estos últimos autores implican a las formas monoméricas y diméricas de A β como las principales, si no las únicas, formas de A β soluble aisladas de pacientes con AD (Walsh et al., 2000; Shankar et al., 2008; Mc Donald et al., 2010). En este sentido, la falta de consenso en los procedimientos y en los anticuerpos empleados a la hora de estudiar los oligómeros solubles de A β podría ser la principal causa implicada en estas discrepancias (Krafft

and Klein, 2009). Evidencias recientes han mostrado la ausencia total de formas oligoméricas de alto peso molecular en los extractos de proteínas solubles obtenidos de pacientes de AD (Shankar et al., 2008; Mc Donald et al., 2010). Sin embargo, es posible que la metodología empleada en estos trabajos no sea adecuada para la detección de dichas formas oligoméricas de alto peso molecular. En este sentido, estos mismos autores muestran oligómeros compatibles con 6-mer y superiores cuando emplean anticuerpos que reconocen el extremo N-terminal (en lugar del C-terminal) del péptido A β para el aislamiento de los oligómeros solubles (Shankar et al., 2008; ver información complementaria). En definitiva, evidencias como ésta sugieren que ciertos epítomos podrían ser de difícil acceso a los anticuerpos dentro de la propia estructura geométrica adoptada por las formas oligoméricas de alto peso molecular en un medio no desnaturizante. Siguiendo este razonamiento, el empleo de anticuerpos contra distintos epítomos del β -amiloide o contra epítomos conformaciones (como A11 y Nu-1) supone posiblemente una de las mejores opciones a la hora de abordar el estudio de las formas oligoméricas solubles de A β .

La mayor parte de los estudios de este tipo, tanto en modelos animales de la enfermedad semejantes al nuestro, como en pacientes de la AD, muestran generalmente la presencia de A β monomérico y de oligómeros de bajo peso molecular (Walsh et al., 2000; Lesne et al., 2006; Shankar et al., 2008; Mc Donald et al., 2010), que nosotros hemos sido incapaces de detectar en nuestros extractos de proteínas solubles (S1). En este trabajo hemos mostrado la presencia de A β monomérico intracelular en sinaptosomas de animales de 18 meses, así como de monómeros y oligómeros de bajo peso molecular en extractos de proteínas de membrana solubilizados con detergentes a partir de los 6 meses de edad (ver apartado 5 de resultados). El A β monomérico extraído con detergentes posiblemente tiene origen en los depósitos de A β extracelulares (Caballero et al., 2007). Por lo tanto, es posible que la adición de detergentes en el medio de homogenización de los tejidos pueda promover tanto la liberación de los péptidos A β vesiculados en sinaptosomas como una extracción parcial de los mismos de las placas. Otros trabajos que emplean un modelo similar al nuestro apoyan esta idea, ya que han descrito la presencia de monómeros y oligómeros de bajo peso molecular junto con oligómeros de 6-, 9- y 12-mers tras la adición de concentraciones bajas de detergentes (SDS 0.1%; NP-40 0.01%) al buffer de homogenización (Lesne et al., 2006).

Por otra parte, en base a nuestros resultados también pensamos que las condiciones de homogenización de los tejidos pueden ser determinantes y pueden

DISCUSIÓN

llevar a la contaminación de los extractos de proteínas solubles con A β monomérico procedente de placas. En este sentido, nosotros también hemos mostrado, previamente a este trabajo, A β monomérico en los extractos de proteínas solubles (S1) tras empelar una proporción 1:5 tejido:tampón de homogenización (Jimenez et al, 2008). De forma similar, otros autores también han empleado esta metodología y han mostrado la presencia de formas monoméricas y diméricas de A β en los extractos de proteínas solubles obtenidas mediante ultra-centrifugación (Shankar et al., 2008; Mc Donald et al., 2010). En nuestro caso, el cambio en la proporción de 1:5 a 1:20 (tejido:medio de homogenización) originó los resultados mostrados en este trabajo, donde aparentemente no hemos encontrado formas monoméricas u oligómeros de bajo peso molecular. Estos resultados sugieren que una alta concentración de membranas en el medio tras la homogenización del tejido podría incurrir en una precipitación menos eficiente de los péptidos de A β insolubles procedentes de las placas. De estas evidencias podemos concluir que el procedimiento seguido en el aislamiento de estas muestras puede influir de forma drástica en las formas de A β detectadas en los extractos de proteínas solubles, y podría explicar en parte las discrepancias encontradas este sentido entre nuestros resultados y otros mostrados en la literatura.

En conclusión, los datos actualmente presentes en la literatura sobre las especies oligoméricas solubles de A β que participan en el desarrollo de la AD son abundantes y muy diferentes. En el caso de los estudios en cultivos celulares y animales de experimentación estas causas podrían estar justificadas en base a la naturaleza de las muestras de partida. Sin embargo, cuando comparamos modelos de la enfermedad similares o muestras procedentes de los propios enfermos, estas discrepancias resultan en cierto modo incomprensibles y en gran medida deben ser consecuencia de las diferencias metodológicas a la hora de abordar el estudio, más que a las muestras per sé.

Finalmente, debemos prestar atención a la relación entre la estructura de los oligómeros y los mecanismos de patogénesis. En este trabajo, hemos demostrado que los oligómeros de A β pueden inhibir la vía PI3K-AKT-GSK-3 β . Puesto que nuestras muestras presentan solamente oligómeros de alto peso molecular (de 6-mer hasta 22-mer), podemos proponer que este efecto debería estar mediado específicamente por estas formas de A β . Del mismo modo, un efecto de inhibición sobre la señalización similar al mostrado en este trabajo ha sido previamente descrito por Townsend et al., 2007. Sin embargo, en este caso el efecto viene dado por oligómeros de bajo peso

molecular (dímeros, trímeros y tetrámeros) obtenidos a partir de cultivos celulares. Además, otras evidencias en la literatura muestran que super-agregados solubles de A β (ASPD) presentes en enfermos de AD, también son capaces de inducir la actividad de GSK-3 β *in vivo* (posiblemente a través del eje PI3K-AKT-GSK-3 β) (Noguchi et al., 2009; Hoshi et al., 2003). Por lo tanto, es posible que distintas formas de agregación de A β puedan mediar este efecto, lo que sugiere que distintos oligómeros de A β independientemente del tamaño podrían presentar estructuras patológicas y mecanismos de acción comunes (Kayed et al., 2003).

3. Mecanismos moleculares y celulares implicados en el aumento de A β oligomérico asociado al envejecimiento.

En la segunda mitad de este trabajo hemos abordado los mecanismos moleculares y celulares implicados en el aumento de la concentración de los oligómeros solubles de A β durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. En este sentido, la proporción ~4:1 de A β 42:40 detectada, al menos a nivel intracelular, ha sido descrita como una condición idónea donde la nucleación de formas oligoméricas de A β tiene lugar tan rápido como si se tratara de A β 42 puro. Además, esta razón requiere mayor tiempo para formar fibras que A β 42 puro o que las mezclas enriquecidas en A β 40, lo que justifica que la mayoría de los péptidos de A β se presenten como oligómeros solubles, más que como fibras (Kuperstein et al., 2010). En este sentido, también se ha descrito que las formas monoméricas y oligoméricas del péptido A β mantienen un equilibrio continuo en condiciones fisiológicas (Narayanan and Reif, 2005). Teniendo en cuenta estas evidencias, nuestra hipótesis inicial proponía que un aumento en la producción de A β asociado a la edad, podría desplazar este equilibrio dando lugar a una mayor concentración de agregados solubles de A β en los animales viejos, y como consecuencia a la progresión de la patología según la teoría de la cascada del β -amiloide (Hardy and Selkoe, 2002).

De acuerdo con nuestra propuesta inicial, en este trabajo hemos demostrado que los animales viejos PS1xAPP presentan un aumento en la concentración de los sustratos de la vía (APP-FL y C99) y una mayor actividad β - y γ -secretasa que los animales jóvenes. En congruencia con este incremento en la actividad secretasa, también hemos mostrado una fuerte acumulación de A β a nivel extra- e intracelular. El aumento en la actividad β -secretasa en nuestro modelo, viene precedido por una acumulación en la forma madura de BACE-1 que, aparentemente, no guarda relación con la expresión a nivel transcripcional del gen, en concordancia con otros resultados en enfermos y otros modelos de la enfermedad (Zohar et al., 2005; Hebert S. et al.,

DISCUSIÓN

2008). En consonancia con el aumento en la actividad β -secretasa, la actividad γ -secretasa también experimenta un incremento asociado al envejecimiento en animales PS1xAPP. Nuestros resultados sugieren que este incremento de actividad γ -secretasa debería ser consecuencia no solo del aumento de C99, sino también de la acumulación del complejo γ -secretasa maduro, a juzgar por el incremento en PS1-CTF en los animales viejos (Placanica et al., 2009; Laudon et al., 2004). Al igual que en el caso de BACE, la acumulación de PS1-CTF no se acompaña de cambios significativos en la expresión transcripcional del transgén PS1 humano. En conjunto, los cambios en la actividad secretasa mostrados en nuestro modelo están precedidos aparentemente por una acumulación tanto de los sustratos, como de las enzimas implicadas en la vía, lo que podría explicar, al menos en parte, la acumulación de $A\beta$ ligada al envejecimiento de nuestro modelo.

Los mecanismos moleculares que llevan al incremento en la forma madura de BACE y el consiguiente incremento en la actividad β -secretasa están actualmente en debate. En este sentido, se ha propuesto que el incremento en la forma madura de BACE-1 se produce como consecuencia de la estabilización de la proteína. Por otra parte, también se ha propuesto que el incremento en la eficiencia transcripcional del mRNA maduro podría determinar el aumento en la forma madura de BACE. En ambos casos, se produce el incremento en los niveles de la forma madura y en la actividad β -secretasa, sin que tengan lugar cambios en la expresión del gen (Tesco et al., 2007; Hebert S. et al., 2008; O'Connor et al., 2008). Alternativamente a estas evidencias, en este trabajo mostramos que las alteraciones (deficiencias) en el transporte axonal y/o en la autofagia que se producen en nuestro modelo también podrían justificar el aumento de la actividad β - y γ -secretasa.

En este contexto, en los resultados de este trabajo hemos mostrado que nuestros animales PS1xAPP presentan una fuerte acumulación de vesículas autofágicas con respecto a WT, y durante el proceso de envejecimiento. De hecho, parece existir una relación entre la acumulación de vesículas y la estimulación dependiente de la edad de la ruta amiloidogénica en estos animales, de acuerdo con algunas evidencias como:

- i) La acumulación de los sustratos de la vía APP/APP-CTFs tiene lugar preferentemente en las neuritas distróficas que rodean las placas de β -amiloides, coincidiendo con la localización intracelular donde tiene lugar la acumulación de las vesículas autofágicas. Además, evidencias reportadas por otros autores muestran que BACE-1 y PS1 también se

acumulan en estas distrofias en modelos similares al nuestro (Yu et al., 2005; Zhao et al., 2007; Zhang et al., 2009).

- ii) APP-FL y C99, así como BACE-1 y PS1-CTF se acumulan en una fracción de proteínas de membrana resistentes a CHAPS, junto con el marcador de vesículas autofágicas LC3-II (Kaganovich et al., 2008).
- iii) La mayor parte de APP-FL y C99 presente en microsomas muestra una co-localización estadísticamente significativa, en el mismo rango de densidad, que LC3-II y que el marcador de vesículas autofágicas maduras Rab-7.
- iv) La mayor parte de APP-FL, C99 y A β acumulados a nivel intracelular se localizan en una fracción enriquecida en vesículas autofágicas obtenida mediante centrifugación diferencial en gradiente de densidad.

En conjunto, todas estas evidencias sugieren que el incremento en la actividad enzimática, implicada en la producción de A β , podría estar directamente ligado a la acumulación de vesículas autofágicas durante el proceso de envejecimiento de los animales PS1xAPP.

Nuestro modelo presenta acumulación de vesículas no sólo en neuritas distróficas, sino también en las terminales sinápticas, desde edades tempranas (3-4 meses), que evolucionan progresivamente durante el envejecimiento de los animales (ver también Blanchard et al., 2003; Boutajangout et al., 2004; Baglietto-Vargas et al., 2010). Coincidiendo con esta acumulación en distrofias y terminales sinápticas, también hemos mostrado que la acumulación de los precursores de A β y del propio β -amiloide no se distribuye igual entre microsomas y sinaptosomas como consecuencia de las alteraciones del tráfico vesicular. APP-FL, y especialmente C99, se encuentran más concentrados en microsomas, coincidiendo con la intensa inmunotinción que aparece en las neuritas distróficas en torno a placas, y en congruencia con los datos reportados tras la ligación del nervio ciático en otros modelos animales (Lee et al., 2005). Por el contrario, el péptido A β se acumula mayormente en sinaptosomas (ver también Fein et al., 2008), en concordancia con la literatura que muestra que la producción de β -amiloide debe tener lugar preferentemente a nivel sináptico (Cirrito et al., 2005; Cirrito et al., 2008). A esta segregación en la distribución de los precursores y del propio péptido β -amiloide, se suma que BACE-1 y PS1-CTF presentan una distribución similar entre microsomas y sinaptosomas, independientemente de la edad

DISCUSIÓN

estudiada (ver también Kasa et al., 2001; Papp et al., 2002). En conclusión, estos resultados sugieren que la actividad β - y γ -secretasa debe tener lugar en las vesículas transportadas a lo largo de los axones y, en consecuencia, en todas aquellas acumuladas tras la disfunción del tráfico vesicular en el neuropilo. A su vez, estos resultados sugieren que la disfunción del tráfico vesicular que aparece de forma progresiva en nuestro modelo debe tener como consecuencia la acumulación preferente de los precursores en la región axonal proximal y del péptido A β en la región axonal distal a los cuerpos neuronales.

En relación con las posibles causas que podrían llevar a una disfunción del tráfico vesicular durante el proceso de envejecimiento en los animales PS1xAPP, en este trabajo hemos mostrado que: i) la fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos tau está incrementada y tiene lugar preferentemente en las neuritas distróficas que aparecen en torno a las placas; ii) la cadena pesada de la proteína motora kinesina-1 sufre una degradación progresiva; y iii) existe una pérdida del neurofilamento no fosforilado, que desemboca en la hiperfosforilación de estos componentes del citoesqueleto axonal.

En este sentido, ha sido descrito que el transporte de la proteína APP en vesículas a través de los axones tiene lugar a través de microtúbulos y por mediación de la proteína motora kinesina-1 (Muresan et al., 2009). Podemos por tanto deducir que la hiperfosforilación de tau y la degradación de kinesina-1 podrían estar mediando la acumulación de vesículas que contienen APP, y posiblemente la estimulación de la vía amiloidogénica en nuestro modelo durante el envejecimiento. En esta línea, tanto kinesina-1 como tau son sustratos de GSK-3 β (Lazarov et al., 2007; Decker et al., 2010), por lo que la activación de GSK-3 β que se produce en los animales viejos PS1xAPP, podría llevar a la fosforilación de estas proteínas. En este sentido, la fosforilación de tau induciría su desacoplamiento de los microtúbulos (Hernandez and Avila, 2007), y la fosforilación de kinesina-1 conllevaría su desacoplamiento de las vesículas transportadas y, por consiguiente, a su degradación (Li et al., 1999). Sin embargo, los problemas de transporte axonal en nuestro modelo aparecen desde edades tempranas, coincidiendo con un aumento moderado en la fosforilación de tau (reconocido por AT-8) y cierta degradación de la cadena pesada de kinesina en los animales de 6 meses. Por lo tanto, si bien en las edades más avanzadas la activación de GSK-3 β podría jugar un papel en la disfunción del transporte axonal induciendo la fosforilación de kinesina y tau, parece poco probable que participe en los animales jóvenes PS1xAPP en los que GSK-3 β se encuentra aparentemente inhibida. Aunque,

alternativamente, la activación de GSK-3 β también podría producirse localmente, a nivel de las distrofias, afectando a áreas muy concretas en los axones neuronales, y pasando desapercibida a nuestras técnicas de detección.

Otros posibilidades han sido propuestas para explicar la disfunción axonal, como la activación de la caseína quinasa 2 por A β oligomérico intracelular, ya que las cadenas pesadas y ligeras de kinesina-1 son sustratos de esta quinasa (Pigino et al., 2009). Sin embargo, la concentración de formas oligoméricas detectadas (en sinaptosomas) es muy baja en los animales de 6 meses, siendo prácticamente indetectable incluso empleando inmunoprecipitación a partir de una cantidad considerable de proteína de partida. Por lo tanto, nuestros resultados no otorgan demasiada importancia al péptido A β intracelular oligomérico como una posible causa de la disfunción en el tráfico vesicular en los animales jóvenes, aunque sí podría activar la caseína quinasa en los animales viejos, en los que existe una fuerte acumulación intracelular de A β .

Del mismo modo, recientemente también se ha descrito que los oligómeros de A β , localizados a nivel extracelular, pueden inducir la formación de distrofias en cultivos primarios de neuronas hipocampales a través del receptor p75NTR (Knowles et al., 2009). Este efecto podría estar mediado por una baja concentración de péptidos A β en el espacio extracelular (del rango de nM) (Susen and Blöchl, 2005). Coincidiendo con estas evidencias, en este trabajo hemos detectado A β soluble en las fracciones S1 de los animales PS1xAPP de 6 meses (en un rango pM) y la presencia de oligómeros de A β reconocidos por el anticuerpo específico A11. Por lo tanto, estos resultados sugieren que un mecanismo como éste podría mediar la formación de distrofias en los axones desde edades tempranas en nuestro modelo. Por otro lado, la fuerte asociación física que muestra la aparición y progresión en el número de distrofias axonales en torno a los de depósitos amiloideos invita a pensar que los péptidos A β presentes en las placas podrían mediar la formación de distrofias en los axones (Meyer-Luehmann et al., 2008). Apoyando esta posibilidad, en el último apartado de resultados de este trabajo hemos mostrado que la fracción de A β insoluble presente en nuestro modelo desde edades tempranas, también presenta oligómeros de A β . Además, y en concordancia con este resultado, recientemente se ha descrito que ciertos lípidos de membrana presentes en el cerebro de forma fisiológica pueden revertir la agregación fibrilar del péptido β -amiloide a oligómeros solubles (Martins et al., 2008). Por lo tanto, la baja concentración de formas oligoméricas, detectadas en nuestro modelo en edades tempranas podría tener origen

DISCUSIÓN

en las placas y podría actuar a nivel local induciendo la aparición de distrofias en los axones circundantes a las placas.

El papel que puede jugar el receptor de neurotrofinas p75 mediando el efecto de los oligómeros de A β en la formación de distrofias axonales está limitado por la baja expresión que presenta este receptor en la membrana de las neuronas hipocampales (Dr. A Gutierrez, resultados no publicados). Sin embargo, está apoyado por estudios adicionales que muestran, en un modelo de transgénico similar al nuestro y *knock-out* para p75NTR, una disminución significativa en la aparición de distrofias en neuronas hipocampales aun en presencia de una carga amiloide extracelular similar (Knowles et al., 2009). En este sentido, el mecanismo de acción intracelular por el cual la estimulación de p75NTR, mediada por A β oligomérico, podría inducir la formación de las distrofias aun no está bien definido. Sin embargo, podemos especular que la activación de JNK (c-Jun quinasa) (Coulson, 2006) podría inducir la fosforilación de la cadena pesada de kinesina-1 (Morfini et al., 2006; Morfini et al., 2009), que a su vez induciría el desacoplamiento de su carga y degradación (Li et al., 1999). Por otro lado, la unión como agonista del péptido A β oligomérico a p75 podría activar la vía Ras-ERK, induciendo un crecimiento anormal de nuevas neuritas (Susen and Blöchl, 2005). Otras posibilidades podrían pasar por la activación de RhoA-GTPasa (Chacon et al., 2010; Lin and Koleske, 2010). Sin embargo, no podemos descartar que otros receptores de membrana, así como otras vías de señalización intracelular, o efectos de los oligómeros sobre las propiedades de las membranas plasmáticas puedan mediar este efecto tóxico del β -amiloide.

Otra cuestión abordada experimentalmente en este trabajo residía en conocer por qué la acumulación de vesículas autofágicas se acompaña de la acumulación de los precursores, y del péptido A β a nivel intracelular, sin que tenga lugar su degradación por enzimas lisosomales (Shinohara et al., 2010; Yang et al., 2011; Jaeger et al., 2010). Inicialmente, la alteración en el tráfico de vesículas que tiene lugar en nuestro modelo durante el proceso de envejecimiento podría ser razón suficiente para justificar que no exista fusión de las vesículas autofágicas acumuladas con lisosomas (Köchl et al., 2006). Sin embargo, existen evidencias en la literatura que muestran que la actividad de las enzimas lisosomales tiene lugar en los sitios celulares de acumulación de vesículas como las neuritas distróficas (Perez-Gracia et al., 2008). Por lo tanto, la acumulación de los factores implicados en la ruta amiloidogénica podría ser debido, no sólo a los defectos en el tráfico vesicular, sino también a las deficiencias en la degradación del contenido de las vesículas por parte de las enzimas

lisosomales durante el proceso de envejecimiento de nuestros animales PS1xAPP (Cuervo and Dice, 2000; Butler D et al., 2006).

En este sentido, varias evidencias en la literatura han descrito un papel para presenilina-1, independientemente del complejo γ -secretasa, en la degradación de proteínas por vía autofágica-lisosomal tanto *in vivo* como *in vitro* (Cataldo et al., 2004; Lee et al., 2010; Neely et al., 2011). Más concretamente, recientemente se ha atribuido a presenilina-1 la función de maduración de la subunidad V0a1 de la bomba de protones vesicular encargada de la acidificación lisosomal (Lee et al., 2010). En concordancia con estas evidencias, cultivos neuronales carentes de presenilina-1 mostraron que esta deficiencia impide la degradación de telencefalina, e induce su acumulación en vesículas autofágicas (Esselens et al., 2004). Por tanto, la pérdida de función de presenilina-1 podría repercutir en una acidificación insuficiente de los lisosomas, lo que posiblemente podría impedir la fusión de las vesículas autofágicas y los lisosomas (Yamamoto A et al., 1998; Peri and Nessler-Volhard, 2008; Sobota et al., 2009), y esto a su vez repercutiría en la acumulación de las proteínas degradadas por esta vía.

En contra de lo esperado en base a lo anteriormente expuesto, nuestro modelo (que porta la mutación M146L en presenilina-1) muestra un fuerte incremento en la forma madura de la subunidad V0a1 de la bomba de protones vesicular, con respecto a WT, a los 6 meses. En este sentido, nuestros resultados sugieren que este aumento podría corresponder a un incremento en la maduración de esta subunidad, ya que no hemos encontrado relación alguna con la expresión a nivel transcripcional. Por otra parte, este aumento en la forma madura de V0a1 coincide en los animales jóvenes con el incremento en la expresión de beclina 1 y de BAG3 (con respecto a BAG1), lo que sugiere que estos animales podrían presentar una estimulación del flujo autofágico y posiblemente de la degradación de proteínas por vía autofágica-lisosomal. Las causas subyacentes a esta inducción de la autofagia son actualmente desconocidas, aunque podemos suponer que podría tratarse de una respuesta compensatoria a la acumulación de vesículas que acontece en nuestro modelo desde edades tempranas. De hecho, bajo estas circunstancias es posible que una parte importante de las vesículas autofágicas acumuladas puedan fusionarse con lisosomas llevando a una degradación eficiente de su contenido y por lo tanto a la homeostasis del sistema (Perez-Gracia et al., 2008). Sin embargo, en contrapunto al incremento que mostraron la expresión de BAG3/BAG1 y beclina-1 también durante el envejecimiento, la forma madura de la subunidad V0a1 muestra un fuerte descenso en los animales PS1xAPP

DISCUSIÓN

viejos, lo que podría traducirse en una posible insuficiencia en la acidificación de los lisosomas en estos animales con respecto a los jóvenes. Esta aparente pérdida de capacidad podría acompañarse de una degradación por vía lisosomal menos eficiente que la que tendría lugar en los animales jóvenes, lo que posiblemente podría repercutir en la acumulación de las proteínas implicadas en la vía amiloidogénica (ver también Mueller-Steiner et al., 2006). En congruencia con esta hipótesis, la alcalinización in vitro de los lisosomas, empleando cloroquina, induce la acumulación de APP-FL y APP-CTFs, así como de PS1-CTF (ver también Vingtdoux et al., 2007; Ohta K. et al., 2010; Boland et al., 2010).

Finalmente, los datos obtenidos en la expresión de BAG3/BAG1 y beclina-1 sugieren que el flujo autofágico podría estar inducido durante el envejecimiento, no sólo en animales PS1xAPP, sino también en los WT. Sin embargo, aparentemente no hemos encontrado una acumulación de vesículas autofágicas en estos animales WT, lo que demuestra que la acumulación de vesículas que tiene lugar en los animales PS1xAPP durante el envejecimiento aparece como causa de alteraciones en el transporte axonal, y no como consecuencia de la estimulación de la autofagia. Además, estos datos estarían en congruencia con recientes hallazgos que muestran que la estimulación de la autofagia, per se, no conduce a la acumulación de APP/APP-CTFs, sino que es necesario que haya un defecto en la ruta que lleve a la acumulación de las vesículas para que tenga lugar la acumulación de los precursores del β -amiloide (Boland et al., 2010).

En conclusión, nuestros resultados apuntan a que la estimulación de la vía amiloidogénica asociada al envejecimiento de nuestro modelo acontece como causa de la acumulación de vesículas autofágicas. A su vez la acumulación de estas vesículas tendría lugar como: i) consecuencia de las deficiencias en el transporte vesicular axonal; ii) insuficiente fusión con lisosomas y iii) reducción de la capacidad lisosomal; lo que finalmente repercutiría en la acumulación de las proteínas funcionales implicadas en la vía amiloidogénica en estas vesículas.

4. Acumulación de A β intracelular como posible origen de las formas oligoméricas solubles extracelulares.

Como hemos comentado en el apartado anterior, condiciendo con la acumulación de vesículas, en nuestro modelo aparece una estimulación de la ruta amiloidogénica y un aumento en la concentración de A β a nivel intra- y extracelular. En este sentido, la acumulación de A β a nivel intracelular podría suponer una fuente de

formas oligoméricas de A β que podrían ser secretadas al medio extracelular donde ejercerían su acción citotóxica. Sin embargo, aunque las evidencias mostradas en este trabajo y otras reportadas en la literatura sugieren que el péptido A β se produce y acumula en vesículas autofágicas (Takahashi et al., 2004; Yu et al., 2005; Ma et al., 2010), con la metodología empleada en este trabajo, no hemos conseguido demostrar que el péptido A β intracelular se encuentre compartimentalizado en vesículas autofágicas. En el caso de los microsomas, es posible que los resultados obtenidos correspondan a un artefacto consecuencia de las centrifugaciones de alta velocidad que empleamos en nuestros protocolos de fraccionamiento y que podrían llevar a la liberación del péptido inicialmente vesiculado. De hecho, otras evidencias presentes en la literatura abogan por esta posibilidad (Takahashi et al., 2004), y proponen que el péptido A β producido en las distrofias axonales podría constituir el núcleo en la formación de los depósitos extracelulares de A β (Zhang et al., 2009; Fiala, 2007; Gouras et al., 2005).

Por otro lado, nuestros resultados han demostrado que la acumulación de A β en sinaptosomas es mayoritaria y corresponde principalmente a la forma monomérica, mientras que las formas oligoméricas se encuentran en muy baja concentración. Además, aun en menor concentración, el perfil de formas oligoméricas observado a nivel intracelular (sinaptosomas) y a nivel extracelular (S1), tras inmunoprecipitación con anticuerpos específicos, son muy similares entre sí. De hecho, aparentemente la única diferencia entre ambos es la presencia de A β monomérico en sinaptosomas. Estas evidencias sugieren que el péptido acumulado de forma intracelular podría ser secretado al medio extracelular, posiblemente desde las terminales sinápticas (Cirrito et al., 2005; Cirrito et al., 2008), y en menor grado, desde las distrofias que rodean los depósitos amiloideos (Zhang et al., 2009; Gouras et al., 2005). Por otra parte, teniendo en cuenta la fuerte acumulación de A β monomérico que tiene lugar en los sinaptosomas de los animales viejos, es muy posible que los oligómeros detectados sean producto de la oligomerization de estas formas monoméricas dentro de las propias vesículas. En este sentido, no hemos conseguido inmunoprecipitar formas oligoméricas de bajo peso molecular a partir de sinaptosomas empleando el anticuerpo 6E10, lo que sugiere que la concentración de A β monomérico presente en las vesículas podría llevar a un nivel de agregación exclusivamente en forma de oligómeros de alto peso molecular (Bitan et al., 2003; Bernstein et al., 2005). Sin embargo, sigue siendo una incógnita cómo el péptido A β , y en general el contenido acumulado y no degradado en vesículas autofágicas, podría ser secretado al medio

DISCUSIÓN

extracelular, aunque algunos autores han sugerido que podría ser en forma de exosomas (Rajendran et al., 2006; Sharples et al., 2008).

En base a nuestros resultados, la prácticamente ausencia de A β monomérico en las fracciones S1 podría reflejar la alta eficiencia en los mecanismos de aclaramiento extracelulares. De esta forma, el péptido A β monomérico secretado podría ser agregado en placas, degradado a través de enzimas como IDE ó neprelisina, fagocitado por la glia o aclarado a través de la barrera hematoencefálica (Vardy et al., 2005; Zhao et al., 2009; Kong et al., 2010). Por el contrario, las formas oligoméricas podrían permanecer en el medio soluble debido a la ineficiencia de los sistemas celulares de aclaramiento contra el aumento en estas formas de A β (Walsh et al., 2002; Numata and Kaplan, 2010). En este sentido, la inhibición de la señalización intracelular mediada por los receptores de insulina e IGF-1, que tiene lugar en los animales viejos PS1xAPP, también podría inducir una ineficiente degradación de A β por estos sistemas de aclaramiento (Carro et al., 2002; Zhao et al., 2009). Un mecanismo como éste podría explicar la ausencia de monómeros de A β en el medio extracelular y la baja concentración de oligómeros detectada en los sinaptosomas con respecto a la presente en el medio extracelular. Además la liberación de los péptidos A β al medio debería dar lugar a un efecto de dilución, lo que podría explicar la aparición del oligómero 6-mer exclusivamente en las fracciones S1 y no en sinaptosomas.

Finalmente, aunque en este trabajo hemos propuesto un origen intracelular para la acumulación de oligómeros solubles de A β en el medio extracelular, no podemos descartar otras posibles fuentes de los mismos, como los depósitos extracelulares de A β (Koffie et al., 2009) o la microglía (Kiyota et al., 2009). A este respecto, en animales viejos, los depósitos insolubles de A β presentan una parte más lábil (fácilmente solubilizable) que libera abundantes formas monoméricas y oligoméricas de A β . Este hecho coincide con el aumento de tamaño y cambio de forma observado en las placas de A β a los 18 meses (resultados no publicados; ver también Hefendehl et al., 2011). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la mayor parte del péptido presente en placas sólo se solubiliza con SDS, es posible que esta fracción de A β corresponda a la parte más lábil de la placa, que podría liberar oligómeros durante el proceso de envejecimiento de los animales PX1xAPP. Sin embargo, si estos oligómeros se forman intrínsecamente en las placas, o corresponden a oligómeros de origen intracelular posteriormente agregados como fibras, es una incógnita.

Por otra parte, y como ya hemos mencionado anteriormente, también podemos especular que la composición lipídica de las membranas podría cambiar durante el proceso de envejecimiento, lo que a su vez podría repercutir en la reversión de las formas fibrilares de A β a oligómeros solubles en los animales viejos PS1xAPP (Martins et al., 2008). Sin embargo, al menos en este trabajo, no hemos mostrado cambios en los niveles de colesterol, aunque esfingolípidos y fosfolípidos aun no han sido estudiados, y por lo tanto, es una posibilidad que queda abierta en este estudio.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir un posible origen intracelular para las formas oligoméricas de A β , aunque no podemos descartar otras fuentes como las placas del β -amiloide o la microglía. En este sentido, es posible que la propia estructura de estas especies de A β (oligómeros de alto peso molecular) las haga inaccesibles a los mecanismos de aclaramiento que habitualmente son eficientes para las formas monoméricas (Walsh et al., 2002; Numata and Kaplan, 2010), llevando finalmente a su acumulación en el medio extracelular. Finalmente, como ya hemos discutido previamente, la acumulación extracelular de estos oligómeros de A β estaría implicada en la reacción inflamatoria citotóxica y en la activación de GSK-3 β que tiene lugar en nuestros animales PS1xAPP viejos. Por lo tanto, la acumulación de estas formas en el medio extracelular puede desencadenar la degeneración neuronal acaecida en estos animales por distintos mecanismos moleculares.

5. Implicaciones de los los resultados obtenidos en el modelo transgénico PS1_{M146L}xAPP_{751-SL} en la patología humana.

En consonancia con los resultados mostrados en nuestros animales, los enfermos de AD también presentan acumulación de vesículas autofágicas en neuritas distróficas, similar a la que hemos mostrado en nuestro modelo durante el envejecimiento (Nixon et al., 2005; Ma et al., 2010). En este sentido, aunque aún no hemos abordado en profundidad esta cuestión en muestras humanas, nuestros resultados preliminares también muestran una acumulación de APP-FL en estos enfermos. Sin embargo, no hemos encontrado aparentemente acumulación de APP-CTFs en los enfermos de AD con respecto a controles de la misma edad, (ver también Russo et al., 2001; Sergeant et al., 2002), aunque sí observamos acumulación entre Braak II y Braak V-VI (ver también Hebert S. et al., 2008).

Por otra parte, en lo que se refiere a la actividad secretasa, en los enfermos de AD también se ha descrito un aumento en la actividad β -secretasa y en la

DISCUSIÓN

estabilización de la proteína BACE-1 en distintas regiones cerebrales afectadas por la enfermedad, al igual que en nuestro modelo (Fukumoto et al., 2002; Sun et al., 2006; Miners et al., 2010; Ahmed et al., 2010). Sin embargo, las evidencias en la literatura que relacionan este incremento en la forma madura de BACE-1 con la acumulación de vesículas debido a deficiencias en el transporte en casos de la enfermedad son escasas. Por otro lado, si este aumento en la actividad β -secretasa se traduce en un incremento en la actividad γ -secretasa es en gran medida una incógnita, y existen pocas evidencias en la literatura que demuestren un incremento de este procesamiento en los enfermos de AD (Borghini et al., 2010).

Por lo tanto, si bien los mecanismos propuestos en este trabajo podrían tener lugar también en los enfermos de AD, en los que también aparecen alteraciones del tráfico vesicular, no todas las evidencias encontradas en el modelo aparecen en los enfermos, o bien no han sido descritas. De hecho, nuestras investigaciones más recientes centran el mismo estudio desarrollado en el modelo animal en muestras humanas, con la finalidad de esclarecer si las alteraciones presentes en nuestro modelo que incurren en una estimulación de la vía amiloidogénica también acontece en la patología humana.

Otra de las incógnitas de la AD es cómo las mutaciones en PS1 de los casos familiares producen una acumulación de $A\beta$. Más aún, cómo en ausencia de mutaciones, como en los casos esporádicos, se produce un aumento de $A\beta$ en el cerebro de los enfermos. En este sentido, y como mera especulación, podríamos destacar el hecho de la saturación por sustrato que presenta el complejo γ -secretasa en nuestro modelo. Dicha saturación podría influenciar negativamente sobre el procesamiento de otras proteínas necesarias para la supervivencia neuronal y la homeostasis sináptica, como Notch y N-caderina (De Strooper and Annaert, 2010; Parent AT. and Thinakaran, 2010). En este sentido, la activación de GSK-3 β en los animales PS1xAPP viejos podría producir un incremento en la fosforilación de PS1, que a su vez podría desembocar en un menor procesamiento de N-caderina sin que se afecte el de APP/APP-CTFs (Uemura et al., 2007). Siguiendo este razonamiento, tanto la saturación de γ -secretasa por sustrato como la fosforilación de PS1 mediada por GSK-3 β podrían llevar a una pérdida del procesamiento de moléculas como Notch y N-caderina durante el envejecimiento de los animales PS1xAPP. Los dominios intracelulares de estas moléculas (NICD o N-cad/CTF-2), generados por el procesamiento γ -secretasa, son importantes para la viabilidad y plasticidad neuronal, y por lo tanto una disminución en su producción podría participar en la

neurodegeneración que acontece en nuestros animales viejos, en un mecanismo de acción aparentemente independiente del péptido A β (Pigino et al., 2001; Breunig et al., 2007; Marambaud et al., 2003; Uemura et al., 2006).

En pacientes, donde la acumulación de C99 es menor, sí sería posible que el secuestro de la mayor parte de complejo γ -secretasa en vesículas autofágicas, debido a las alteraciones del tráfico, pudiese llevar a una disminución en el procesamiento de Notch a NICD, ya que aparentemente este procesamiento tiene lugar en la membrana plasmática más que en compartimentos intracelulares (Sorensen and Conner, 2010). Apoyando esta hipótesis, en enfermos de AD se ha descrito la acumulación del fragmento C-terminal de Notch con respecto a controles de la misma edad (Berezovska et al., 1998), lo que sugiere una posible inhibición del procesamiento de Notch por γ -secretasa en estos enfermos. Por otro lado, publicaciones recientes apuntan a un incremento en la actividad de GSK-3 β en los enfermos de AD (Forlenza et al., 2011), a pesar de los datos discrepantes descritos en la literatura en este sentido (Balaraman et al., 2006). Por lo tanto, parece más probable que la fosforilación en PS1 mediada por GSK-3 β pueda mediar una disminución en el procesamiento de N-caderina por parte de γ -secretasa en la AD, sin afectar al posible incremento en la producción de A β (Uemura et al., 2007). Desafortunadamente, la literatura que profundiza en esta cuestión es actualmente escasa, por lo que son necesarias nuevas investigaciones para conocer si un posible incremento en la producción de A β en modelos experimentales y enfermos de AD podría acompañarse de alteraciones en otras vías de señalización celular necesarias para la viabilidad neuronal mediadas por γ -secretasa.

DISCUSIÓN

G. CONCLUSIONS (ENGLISH)

Ph.D. Thesis Conclusions

1. In this work we demonstrated the existence of an age-dependent increase in soluble A β oligomers, located in the extracellular space of a PS1xAPP mouse model. These oligomers were coincident with 6-, 10-, 12-, 20- and 22-mer.
2. Soluble APP α and A β oligomers, presented in PS1xAPP animals, are able to modulate, positively and negatively, the PI3K/AKT/GSK3 β pathway, through IGF-1 and/or insulin receptors. We concluded that while sAPP α present in soluble extracts from young PS1xAPP can induce phosphorylation of GSK-3 β , A β oligomers can block the previously induced phosphorylation of this pro-survival pathway.
3. The APP processing also change in an age-dependent manner. APP, APP-CTFs, BACE-1 and PS1-CTF accumulated in aged PS1xAPP animals. This accumulation was accompanied by an increase in β - and γ -secretase activity in aged animals compared with younger ones.
4. Our model presented an age-dependent accumulation of autophagic vesicles in dystrophic neurites and synaptic terminals, coincident with the accumulation of APP/APP-CTFs. In addition, this accumulation took place in a relatively detergent-resistant membrane fraction, coinciding with accumulation of β -amyloid precursors, BACE-1 and PS1-CTF.
5. The presence of APP and APP-CTFs in autophagic vesicles was demonstrated by electron microscopy, co-location in the same density range in iodoxanol gradients, and accumulation of these precursors in a autophagic vesicles-enriched fraction obtained by ficoll gradient.
6. The presence of axonal transport problems associated to the age of PS1xAPP animals were demonstrated through the study of the degradation of heavy chain of kinessin-1 motor protein, hyperphosphorylation of microtubule associated protein tau, and loss of non-phosphorylated neurofilament implicated in the cytoskeleton architecture.

CONCLUSIONS

7. Our model also presented an impaired maturation of the lysosomal regulatory proton-pump subunit in neurons V0a1, in PS1xAPP aged mice respect to younger ones.
8. Accumulation of A β in synaptosomes (intracellular) and S1 (extracellular) was quite similar during aging in our animals. In addition, our aged PS1xAPP mice showed majorly monomeric A β and a low concentration of high molecular weight A β oligomers quite similar to that observed in soluble protein fractions from these same animals.

H. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Rodriguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, Perga S, Medina M, Delacourte A, Dingwall C, De Strooper B, Dotti CG (2004) Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol* 167: 953-960.
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997) [beta]-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16: 3797-3804.
- Adams JC (1981) Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29: 775.
- Ahmed RR, Holler CJ, Webb RL, Li F, Beckett TL, Murphy MP (2010) BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112: 1045-1053.
- Aisen PS (2000) Anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease - Commentary. *Neurobiology of Aging* 21: 447-448.
- Aisen PS, Schafer K, Grudman M, Pfeiffer E, Sano M, Davis KL, Farlow MR, Jin S, Thomas R, Thal LJ (2003) Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA* 289: 2819-2826.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21: 383-421.
- Alberdi E, Sanchez-Gomez MV, Cavaliere F, Perez-Samartín A, Zugaza JL, Trullas R, Domercq M, Matute C (2010) Amyloid [beta] oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* 47: 264-272.
- Anderton BH (1999) Alzheimer's disease: Clues from flies and worms. *Current Biology* 9: R106-R109.
- Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G (2002) Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-[beta] peptide and associated proteins. *Peptides* 23: 1343-1350.
- Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD, Ling KQ, Huang X, Moir RD, Wang D, Sayre LM, Smith MA, Chen SG, Bush AI (2003) Copper Mediates Dityrosine Cross-Linking of Alzheimer's Amyloid-[beta]. *Biochemistry* 43: 560-568.
- Baas PW, Qiang L (2005) Neuronal microtubules: when the MAP is the roadblock. *Trends in Cell Biology* 15: 183-187.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2010) Calretinin Interneurons are Early Targets of Extracellular Amyloid-[beta] Pathology in PS1/A[beta]PP Alzheimer Mice Hippocampus. *Journal of Alzheimer's Disease* 21: 119-132.

BIBLIOGRAFÍA

- Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Horne P, Wakutani Y, Bagshaw R, Mathews PM, Fraser PE, Westaway D, George-Hyslop P, Schmitt-Ulms G (2008) The in Vivo Brain Interactome of the Amyloid Precursor Protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 7: 15-34.
- Balaraman Y, Limaye A, Levey A, Srinivasan S (2006) Glycogen synthase kinase 3[beta] and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 63: 1226-1235.
- Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 663-672.
- Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horre K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B (2006) Presenilin clinical mutations can affect [gamma]-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96: 732-742.
- Berezovska O, Xia MQ, Hyman BT (1998) Notch Is Expressed in Adult Brain, Is Coexpressed with Presenilin-1, and Is Altered in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 57.
- Bernstein SL, Dupuis NF, Lazo ND, Wytttenbach T, Condrón MM, Bitan G, Teplow DB, Shea JE, Ruotolo BT, Robinson CV, Bowers MT (2009) Amyloid-[beta] protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem* 1: 326-331.
- Bernstein SL, Wytttenbach T, Baumketner A, Shea JE, Bitan G, Teplow DB, Bowers MT (2005) Amyloid [beta]-Protein: Monomer Structure and Early Aggregation States of A[beta]42 and Its Pro19 Alloform. *Journal of the American Chemical Society* 127: 2075-2084.
- Bertrand J, Senechal P, Zummo-Soucy M, Plouffe V, Leclerc N (2010) The formation of tau pathological phospho-epitopes in the axon is prevented by the dephosphorylation of selective sites in primary hippocampal neurons over-expressing human tau. *J Neurochem* 114: 1353-1367.
- Beurel E, Jope RS (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Progress in Neurobiology* 79: 173-189.
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB (2003) Amyloid [beta]-protein (A[beta]) assembly: A[beta]40 and A[beta]42 oligomerize through distinct pathways. *PNAS* 100: 330-335.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A[beta] deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology* 184: 247-263.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *The Lancet* 368: 387-403.
- Boland B, Smith DA, Mooney D, Jung SS, Walsh DM, Platt FM (2010) Macroautophagy Is Not Directly Involved in the Metabolism of Amyloid Precursor Protein. *Journal of Biological Chemistry* 285: 37415-37426.

- Booth RF and Clark JB. A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain (1978). *Biochem J.* 176 (2), 365-370. 15-11-1978.
Ref Type: Magazine Article
- Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1997) Accelerated Amyloid Deposition in the Brains of Transgenic Mice Coexpressing Mutant Presenilin 1 and Amyloid Precursor Proteins. *Neuron* 19: 939-945.
- Borghì R, Piccini A, Barini E, Cirmena G, Guglielmotto M, Tamagno E, Fornaro M, Perry G, Smith MA, Garuti A, Tabaton M (2010) Upregulation of Presenilin 1 in Brains of Sporadic, Late-Onset Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 22: 771-775.
- Boutajangout A, Authelet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion JP (2004) Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiology of Disease* 15: 47-60.
- Braak H, Braak E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1: 213-216.
- Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Aestán N, Rakic P (2007) Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *PNAS* 104: 20558-20563.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 297-305.
- Butler D, Nixon RA, Bahr BA (2006) Potential Compensatory Responses Through Autophagic/Lysosomal Pathways in Neurodegenerative Diseases. *Autophagy* 2: 234-237.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31: 149-160.
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan M, Ramos B, del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, Ruano D, Vitorica J (2007) Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Abeta peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* 85: 787-797.
- Capsoni S, Giannotta S, Cattaneo A (2002) Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *PNAS* 99: 12432-12437.
- Capsoni S, Tiveron C, Vignone D, Amato G, Cattaneo A (2010) Dissecting the involvement of tropomyosin-related kinase A and p75 neurotrophin receptor signaling in NGF deficit-induced neurodegeneration. *PNAS* 107: 12299-12304.
- Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres A, I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8: 1390-1397.

BIBLIOGRAFÍA

- Castegna A, Lauderback CM, Mohmmad-Abdul H, Butterfield DA (2004) Modulation of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by the lipid peroxidation products, 4-hydroxynonenal and acrolein: implications for Alzheimer's disease. *Brain Research* 1004: 193-197.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer Disease. *Disease-a-Month* 56: 484-546.
- Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon RA (1995) Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: Evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* 14: 671-680.
- Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA (1997) Increased Neuronal Endocytosis and Protease Delivery to Early Endosomes in Sporadic Alzheimer's Disease: Neuropathologic Evidence for a Mechanism of Increased [beta]-Amyloidogenesis. *The Journal of Neuroscience* 17: 6142-6151.
- Cataldo AM, Peterhoff CM, Schmidt SD, Terio NB, Duff K, Beard M, Mathews PM, Nixon RA (2004) Presenilin Mutations in Familial Alzheimer Disease and Transgenic Mouse Models Accelerate Neuronal Lysosomal Pathology. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 63.
- Chacon PJ, Arevalo MA, Tebar AR (2010) NGF-activated protein tyrosine phosphatase 1B mediates the phosphorylation and degradation of I-[kappa]-B[alpha] coupled to NF-[kappa]-B activation, thereby controlling dendrite morphology. *Molecular and Cellular Neuroscience* 43: 384-393.
- Chatelat G, Villemagne VL, Pike KE, Ellis KA, Bourgeat P, Jones G, O Keefe GJ, Salvado O, Szoeki C, Martins RN, Ames D, Masters CL, Rowe CC, the Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle Study of ageing (AIBL) Research Group (2011) Independent contribution of temporal [beta]-amyloid deposition to memory decline in the pre-dementia phase of Alzheimer's disease. *Brain* 134: 798-807.
- Chen HSV, Lipton SA (2006) The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97: 1611-1626.
- Chen YR, Glabe CG (2006) Distinct Early Folding and Aggregation Properties of Alzheimer Amyloid-[beta] Peptides A[beta]40 and A[beta]42. *Journal of Biological Chemistry* 281: 24414-24422.
- Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puoliväli J, Lesne S, Ashe KH, Muchowski PJ, Mucke L (2007) Accelerating Amyloid-[beta] Fibrillization Reduces Oligomer Levels and Functional Deficits in Alzheimer Disease Mouse Models. *Journal of Biological Chemistry* 282: 23818-23828.
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM (2008) Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid-[beta] In Vivo. *Neuron* 58: 42-51.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM (2005) Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48: 913-922.

- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* 360: 672-674.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11: 909-913.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *Journal of Molecular Biology* 116: 227-247.
- Cole GM, Frautschy SA (2001) The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. *Experimental Gerontology* 42: 10-21.
- Copanaki E, Chang S, Vlachos A, Tschäpe JA, Muller UC, Kögel D, Deller T (2010) sAPP[α] antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Molecular and Cellular Neuroscience* 44: 386-393.
- Cordy JM, Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ (2006) The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease (Review). *Mol Membr Biol* 23: 111-122.
- Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ (2003) Exclusively targeting [beta]-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates [beta]-site processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11735-11740.
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656.
- Coulson EJ (2006) Does the p75 neurotrophin receptor mediate A[β]-induced toxicity in Alzheimer's disease? *J Neurochem* 98: 654-660.
- Cramer A, Biondi E, Kuehnle K, Lutjohann D, Thelen KM, Perga S, Dotti CG, Nitsch RM, Ledesma MD, Mohajeri MH (2006) The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and A[β] generation in vivo. *EMBO J* 25: 432-443.
- Cuervo AM, Dice JF (2000) Age-related Decline in Chaperone-mediated Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31505-31513.
- Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V (1999) Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 56: 981-987.
- De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A[β] oligomers. *Neurobiology of Aging* 29: 1334-1347.
- De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler Fdr, Annaert W, van Broeckhoven C, De Strooper B (2001) Pathogenic APP mutations near the [gamma]-secretase cleavage

BIBLIOGRAFÍA

- site differentially affect A[β] secretion and APP C-terminal fragment stability. *Human Molecular Genetics* 10: 1665-1671.
- De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active [γ]-Secretase Complex. *Neuron* 38: 9-12.
- De Strooper B (2010) Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. *Physiol Rev* 90: 465-494.
- De Strooper B, Annaert W (2010) Novel Research Horizons for Presenilins and [γ]-Secretases in Cell Biology and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 235-260.
- De Strooper B, Vassar R, Golde T (2010) The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6: 99-107.
- De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CCJ (2008) Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases*. *Annu Rev Neurosci* 31: 151-173.
- Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA (2010) Amyloid- β Peptide Oligomers Disrupt Axonal Transport through an NMDA Receptor-Dependent Mechanism That Is Mediated by Glycogen Synthase Kinase 3 β in Primary Cultured Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 30: 9166-9171.
- DeKosky ST (2003) Pathology and Pathways of Alzheimer's Disease with an Update on New Developments in Treatment. *Journal of the American Geriatrics Society* 51: S314-S320.
- Demuro A (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280: 17294-17300.
- Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006) Different Conformations of Amyloid β Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons. *Journal of Neuroscience* 26: 6011-6018.
- Di X, Yan J, Zhao Y, Zhang J, Shi Z, Chang Y, Zhao B (2010) L-theanine protects the APP (Swedish mutation) transgenic SH-SY5Y cell against glutamate-induced excitotoxicity via inhibition of the NMDA receptor pathway. *Neuroscience* 168: 778-786.
- Dickson TC, Vickers JC (2001) The morphological phenotype of [β]-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105: 99-107.
- Ding WX, Yin XM (2008) Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* 4: 141-150.
- Ding Y, Shen S, Lino AC, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2008) Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. *Nat Med* 14: 162-169.
- Diwu Z, Chen CS, Zhang C, Klaubert DH, Haugland RP (2011) A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. *Chemistry & Biology* 6 (7): 411-418.

- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-[beta]42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 710-713.
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour Bt (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica* 115: 5-38.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80: 1298-1307.
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160: 113-123.
- Engel T, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ (2006) Full Reversal of Alzheimer's Disease-Like Phenotype in a Mouse Model with Conditional Overexpression of Glycogen Synthase Kinase-3. *Journal of Neuroscience* 26: 5083-5090.
- Eric S, Benjamin MT, Enrique JR, nnifer LC, Thomas RN, se T, XJ, ck RW, zanne MdIM (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease* 7: 63-80.
- Eskelinen EL (2005) Maturation of Autophagic Vacuoles in Mammalian Cells. *Autophagy* 1: 1-10.
- Esselens C, Oorschot V, Baert V, Raemaekers T, Spittaels K, Serneels L, Zheng H, Saftig P, De Strooper B, Klumperman J, Annaert W (2004) Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway. *J Cell Biol* 166: 1041-1054.
- Evin G, Weidemann A (2002) Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A[beta] amyloid peptides. *Peptides* 23: 1285-1297.
- Fedorcsak I and Ehrenberg L. (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand.* 20 (1), 107-112.
- Fein JA, Sokolow S, Miller CA, Vinters HV, Yang F, Cole GM, Gylys KH (2008) Co-Localization of Amyloid Beta and Tau Pathology in Alzheimer's Disease Synaptosomes. *The American Journal of Pathology* 172: 1683-1692.
- Fiala J (2007) Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis. *Acta Neuropathologica* 114: 551-571.
- Floden AM, Combs CK (2006) Beta-amyloid stimulates murine postnatal and adult microglia cultures in a unique manner. *J Neurosci* 26: 4644-4648.
- Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HPG, Diniz BS, Gattaz WF (2011) Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatric Research* 45: 220-224.
- Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002) {beta}-Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* 59: 1381-1389.

BIBLIOGRAFÍA

- Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 28: 889-901.
- Gandy S, Zhang Yw, Ikin A, Schmidt SD, Levy E, Sheffield R, Nixon RA, Liao FF, Mathews PM, Xu H, Ehrlich ME (2007) Alzheimer's presenilin 1 modulates sorting of APP and its carboxyl-terminal fragments in cerebral neurons in vivo. *J Neurochem* 102: 619-626.
- Gassen GV, Annaert W (2003) Amyloid, Presenilins, and Alzheimer's Disease. *The Neuroscientist* 9: 117-126.
- Giannakopoulos P, Hof PR, Bouras C (1998) Selective vulnerability of neocortical association areas in Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 43: 16-23.
- Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A (2009) {beta}-Amyloid Monomers Are Neuroprotective. *Journal of Neuroscience* 29: 10582-10587.
- Glabe CG (2008) Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 283: 29639-29643.
- Glennner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120: 885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel J, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 16: 4491-4500.
- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10417-10422.
- Gong Y, Lippa CF, Zhu J, Lin Q, Rosso AL (2009) Disruption of glutamate receptors at Shank-postsynaptic platform in Alzheimer's disease. *Brain Research* 1292: 191-198.
- Gotz J (2001) Tau and transgenic animal models. *Brain Research Reviews* 35: 266-286.
- Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH (2005) Intraneuronal A[beta] accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 26: 1235-1244.

- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 93: 105-117.
- Grimm MOW, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C (2008) Independent Inhibition of Alzheimer Disease [beta]- and [gamma]-Secretase Cleavage by Lowered Cholesterol Levels. *Journal of Biological Chemistry* 283: 11302-11311.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17: 3878-3885.
- Grossi C, Francese S, Casini A, Rosi MC, Luccarini I, Fiorentini A, Gabbiani C, Messori L, Moneti G, Casamenti F (2009) Clioquinol Decreases Amyloid-[beta] Burden and Reduces Working Memory Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 17: 423-440.
- Gu Y, Chen F, Sanjo N, Kawarai T, Hasegawa H, Duthie M, Li W, Ruan X, Luthra A, Mount HTJ, Tandon A, Fraser PE, George-Hyslop P (2003) APH-1 Interacts with Mature and Immature Forms of Presenilins and Nicastrin and May Play a Role in Maturation of Presenilin-Nicastrin Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 278: 7374-7380.
- Gunten Av, Kövari E, Bussi re T, Rivara CB, Gold G, Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P (2006) Cognitive impact of neuronal pathology in the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 27: 270-277.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ (1991) Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *The Journal of Neuroscience* 11: 3783-3793.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid-[beta] peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101-112.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine* 15: 112-119.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297: 353-356.
- He C, Levine B (2010) The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology* 22: 140-149.
- Hebert S., Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahatoglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/[beta]-secretase expression. *PNAS* 105: 6415-6420.
- Hefendehl JK, Wegenast-Braun BM, Liebig C, Eicke D, Milford D, Calhoun ME, Kohsaka S, Eichner M, Jucker M (2011) Long-Term In Vivo Imaging of [beta]-Amyloid Plaque Appearance and Growth in a Mouse Model of Cerebral [beta]-Amyloidosis. *The Journal of Neuroscience* 31: 624-629.

BIBLIOGRAFÍA

- Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, Warren A, McInnis MG, Antonarakis SE, Martin JJ (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature Genet* 3: 218-221.
- Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology* 184: 69-91.
- Hernandez F, Avila J (2007) Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2219-2233.
- Hirokawa N (1993) Mechanism of axonal transport Identification of new molecular motors and regulations of transports. *Neuroscience Research* 18: 1-9.
- Hirose H, Arasaki K, Dohmae N, Takio K, Hatsuzawa K, Nagahama M, Tani K, Yamamoto A, Tohyama M, Tagaya M (2004) Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *EMBO J* 23: 1267-1278.
- Hongisto V, Smeds N, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET (2003) Lithium Blocks the c-Jun Stress Response and Protects Neurons via Its Action on Glycogen Synthase Kinase 3. *Mol Cell Biol* 23: 6027-6036.
- Hood JL, Brooks WH, Roszman TL (2004) Differential Compartmentalization of the Calpain/Calpastatin Network with the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Journal of Biological Chemistry* 279: 43126-43135.
- Horgan J, Miguel-Hidalgo JJ, Thrasher M, Bissette G (2007) Longitudinal Brain Corticotropin Releasing Factor and Somatostatin in a Transgenic Mouse (TG2576) Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 12: 115-127.
- Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N, Sato K (2003) Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *PNAS* 100: 6370-6375.
- Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N, Sato K (2003) Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6370-6375.
- Houeland G, Romani A, Marchetti C, Amato G, Capsoni S, Cattaneo A, Marie H+ (2010) Transgenic Mice with Chronic NGF Deprivation and Alzheimer's Disease-Like Pathology Display Hippocampal Region-Specific Impairments in Short- and Long-Term Plasticities. *The Journal of Neuroscience* 30: 13089-13094.
- Hoyer S (1998) Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose energy metabolism. *J Neural Transm* 187-194.
- Hsieh H (2006) AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52: 831-843.

- Hur JY, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Frånberg J, Winblad B, Frykman S, Tjernberg LO (2008) Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J* 275: 1174-1187.
- Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K (1993) Glycogen synthase kinase 3[beta] is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *Febs Letters* 325: 167-172.
- Itakura E., Mizushima N. (2009) Atg14 and UVRAG: Mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *autophagy* 5: 534-536.
- Iwata H, Tomita T, Maruyama K, Iwatsubo T (2001) Subcellular Compartment and Molecular Subdomain of [beta]-Amyloid Precursor Protein Relevant to the A[beta]-42-promoting Effects of Alzheimer Mutant Presenilin 2. *Journal of Biological Chemistry* 276: 21678-21685.
- Jaeger PA, Pickford F, Sun CH, Lucin KM, Masliah E, Wyss-Coray T (2010) Regulation of Amyloid Precursor Protein Processing by the Beclin 1 Complex. *PLoS ONE* 5: e11102.
- Jiao J, Xue B, Zhang L, Gong Y, Li K, Wang H, Jing L, Xie J, Wang X (2008) Triptolide inhibits amyloid-[beta]1-42-induced TNF-[alpha] and IL-1[beta] production in cultured rat microglia. *Journal of Neuroimmunology* 205: 32-36.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2008) Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *Journal of Neuroscience* 28: 11650-11661.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2011) Age-dependent accumulation of soluble Abeta oligomers reverses the neuroprotective effect of sAPPalpha by modulating PI3K/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mice model. *Journal of Biological Chemistry*.
- Jope RS, Johnson GVW (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences* 29: 95-102.
- Kaganovich D, Kopito R, Frydman J (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454: 1088-1095.
- Kanemitsu H, Tomiyama T, Mori H (2003) Human neprilysin is capable of degrading amyloid [beta] peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neuroscience Letters* 350: 113-116.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736.
- Kar A, Kuo D, He R, Zhou J, Wu JY (2005) Tau Alternative Splicing and Frontotemporal Dementia. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 19.

BIBLIOGRAFÍA

- Karlinski R, Wilcock D, Dickey C, Ronan V, Gordon MN, Zhang W, Morgan D, Tagliatela G (2007) Up-regulation of Bcl-2 in APP transgenic mice is associated with neuroprotection. *Neurobiology of Disease* 25: 179-188.
- Kasa P, Papp H, Pakaski M (2001) Presenilin-1 and its N-terminal and C-terminal fragments are transported in the sciatic nerve of rat. *Brain Research* 909: 159-169.
- Kawahara M, Kuroda Y (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's [beta]-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Research Bulletin* 53: 389-397.
- Kawooya JK, Emmons TL, Gonzalez-DeWhitt PA, Camp MC, D'Andrea SC (2003) Electrophoretic mobility of Alzheimer's amyloid-[beta] peptides in urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 323: 103-113.
- Kayed R, Head E, Sarsoza F, Saing T, Cotman CW, Neula M, Margol L, Wu J, Breydo L, Thompson JL, Rasool S, Gurlo T, Butler P, Glabe CG (2007) Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener* 2: 18.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* 300: 486-489.
- Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B, Birnbaum MJ, Chao MV (2002) Akt1 Regulates a JNK Scaffold during Excitotoxic Apoptosis. *Neuron* 35: 697-709.
- Kimura S., Noda T., Yoshimori T. (2007) Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. *autophagy* 3: 452-460.
- Kiyota T, Yamamoto M, Xiong H, Lambert MP, Klein WL, Gendelman HE, Ransohoff RM, Ikezu T (2009) CCL2 Accelerates Microglia-Mediated A[beta] Oligomer Formation and Progression of Neurocognitive Dysfunction. *PLoS ONE* 4: e6197.
- Klafki HW, Wiltfang J, Staufenbiel M (1996) Electrophoretic Separation of [beta]A4 Peptides (1-40) and (1-42). *Analytical Biochemistry* 237: 24-29.
- Knobloch M, Farinelli M, Konietzko U, Nitsch RM, Mansuy IM (2007) A[beta] Oligomer-Mediated Long-Term Potentiation Impairment Involves Protein Phosphatase 1-Dependent Mechanisms. *Journal of Neuroscience* 27: 7648-7653.
- Knowles JK, Rajadas J, Nguyen TV, Yang T, LeMieux MC, Vander Griend L, Ishikawa C, Massa SM, Wyss-Coray T, Longo FM (2009) The p75 Neurotrophin Receptor Promotes Amyloid-[beta](1-42)-Induced Neuritic Dystrophy In Vitro and In Vivo. *The Journal of Neuroscience* 29: 10627-10637.
- Köchl R, Hu XW, Chan EYW, Tooze SA (2006) Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes. *Traffic* 7: 129-145.

- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT, Spires-Jones TL (2009) Oligomeric amyloid [beta] associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *PNAS* 106: 4012-4017.
- Kohli L, Roth KA (2010) Autophagy: Cerebral Home Cooking. *The American Journal of Pathology* 176: 1065-1071.
- Kojro E, Postina R, Buro C, Meiringer C, Gehrig-Burger K, Fahrenholz F (2006) The neuropeptide PACAP promotes [alpha]-secretase pathway for processing Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB J.* 20 (3): 512-514.
- Kong Y, Ruan L, Qian L, Liu X, Le Y (2010) Norepinephrine Promotes Microglia to Uptake and Degrade Amyloid [beta] Peptide through Upregulation of Mouse Formyl Peptide Receptor 2 and Induction of Insulin-Degrading Enzyme. *The Journal of Neuroscience* 30: 11848-11857.
- Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S (2002) Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* 4: 191-197.
- Krafft GA, Klein WL (2009) ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 59: 230-242.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010) Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell* 40: 280-293.
- Kumar-Singh S, Pirici D, McGowan E, Serneels S, Ceuterick C, Hardy J, Duff K, Dickson D, van Broeckhoven C (2005) Dense-Core Plaques in Tg2576 and PSAPP Mouse Models of Alzheimer's Disease Are Centered on Vessel Walls. *Am J Pathol* 167: 527-543.
- Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, Ball MJ, Roher AE (1996) Water-soluble Ab (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 271: 4077-4081.
- Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, Segers-Nolten I, Van Der Werf K, Subramaniam V, Braeken D, Callewaert G, Bartic C, D'Hooge R, Martins IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease A[beta] peptides is induced by small changes in the A[beta]42 to A[beta]40 ratio. *EMBO J* 29: 3408-3420.
- Kurochkin IV (1998) Amyloidogenic determinant as a substrate recognition motif of insulin-degrading enzyme. *Febs Letters* 427: 153-156.
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid {beta} Oligomers. *Journal of Neuroscience* 24: 10191-10200.

BIBLIOGRAFÍA

- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Sanz Clemente A, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) A[beta] Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 27: 796-807.
- Lambert MP, Velasco PT, Chang L, Viola KL, Fernandez S, Lacor PN, Khuon D, Gong Y, Bigio EH, Shaw P, De Felice FG, Krafft GA, Klein WL (2007) Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem* 100: 23-35.
- Laudon H, Mathews PM, Karlstrom H, Bergman A, Farmery MR, Nixon RA, Winblad B, Gandy SE, Lendahl U, Lundkvist J, Naslund J (2004b) Co-expressed presenilin 1 NTF and CTF form functional gamma-secretase complexes in cells devoid of full-length protein. *J Neurochem* 89: 44-53.
- Lazarov O, Morfini GA, Pigino G, Gadadhar A, Chen X, Robinson J, Ho H, Brady ST, Sisodia SS (2007) Impairments in Fast Axonal Transport and Motor Neuron Deficits in Transgenic Mice Expressing Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutant Presenilin 1. *The Journal of Neuroscience* 27: 7011-7020.
- Lee EB, Zhang B, Liu K, Greenbaum EA, Doms RW, Trojanowski JQ, Lee VMY (2005) BACE overexpression alters the subcellular processing of APP and inhibits A[beta] deposition in vivo. *J Cell Biol* 168: 291-302.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA (2010) Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. *Cell* 141: 1146-1158.
- Lee MS, Kao SC, Lemere CA, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, Neve R, Ahljianian MK, Tsai LH (2003) APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J Cell Biol* 163: 83-95.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440: 352-357.
- Li H, Shen X (2000) Selective loss of basal forebrain cholinergic neurons in APP770 transgenic mice. *Chinesse Medical Journal* 113: 1040-1042.
- Li JY, Pfister KK, Brady S, Dahlstrom A (1999) Axonal transport and distribution of immunologically distinct kinesin heavy chains in rat neurons. *Journal of Neuroscience Research* 58: 226-241.
- Li Y, Chin LS, Levey AI, Li L (2002) Huntingtin-associated Protein 1 Interacts with Hepatocyte Growth Factor-regulated Tyrosine Kinase Substrate and Functions in Endosomal Trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 277: 28212-28221.
- Lin YC, Koleske AJ (2010) Mechanisms of Synapse and Dendrite Maintenance and Their Disruption in Psychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Annu Rev Neurosci* 33: 349-378.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002) Control of [beta]-Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108: 837-847.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408.

- Longatti A, Tooze SA (2009) Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ* 16: 956-965.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35: 605-623.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear [beta]-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3[beta] conditional transgenic mice. *EMBO J* 20: 27-39.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble Amyloid [beta] Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology* 155: 853-862.
- Ma JF, Huang Y, Chen SD, Halliday G (2010) Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36: 312-319.
- Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (2009) [beta]-Amyloid Oligomers Induce Phosphorylation of Tau and Inactivation of Insulin Receptor Substrate via c-Jun N-Terminal Kinase Signaling: Suppression by Omega-3 Fatty Acids and Curcumin. *The Journal of Neuroscience* 29: 9078-9089.
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L (2009) The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Archives of Medical Research* 32: 367-381.
- MacFarlane M, Williams AC. (2004) Apoptosis and disease: a life or death decision. *Embo Reports* 5: 674-678.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006) Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *PNAS* 103: 5644-5651.
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid Dendritic Morphogenesis in CA1 Hippocampal Dendrites Induced by Synaptic Activity. *Science* 283: 1923-1927.
- Malm TM, Iivonen H, Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Ahtoniemi T, Kanninen K, Salminen A, Auriola S, van Groen T, Tanila H, Koistinaho J (2007) Pyrrolidine Dithiocarbamate Activates Akt and Improves Spatial Learning in APP/PS1 Mice without Affecting {beta}-Amyloid Burden. *Journal of Neuroscience* 27: 3712-3721.
- Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP Binding Transcriptional Repressor Produced by the PS1/[epsilon]-Cleavage of N-Cadherin Is Inhibited by PS1 FAD Mutations. *Cell* 114: 635-645.

BIBLIOGRAFÍA

- Martinez-Vicente M, Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *The Lancet Neurology* 6: 352-361.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van Gelder P, Hartmann D, D'Hooge R, De Strooper B, Schymkowitz J, Rousseau F (2008) Lipids revert inert A[beta] amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* 27: 224-233.
- Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H (1982) Isolation of autophagic vacuoles from rat liver: morphological and biochemical characterization. *J Cell Biol* 93: 144-154.
- Masliah E, Westland CE, Rockenstein EM, Abraham CR, Mallory M, Veinberg I, Sheldon E, Mucke L (1997) Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries in vivo. *Neuroscience* 78: 135-146.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *PNAS* 82: 4245-4249.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429: 761-766.
- Mattson MP, Magnus T (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7: 278-294.
- Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM (2010) The presence of sodium dodecyl sulphate-stable A[beta] dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133: 1328-1341.
- McGeer PL, McGeer EG (2001) Polymorphisms in Inflammatory Genes and the Risk of Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* 58: 1790-1792.
- Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid-[bgr] plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451: 720-724.
- Miners JS, Van Helmond Z, Kehoe PG, Love S (2010) Changes with Age in the Activities of [beta]-Secretase and the A[beta]-Degrading Enzymes Nephilysin, Insulin-Degrading Enzyme and Angiotensin-Converting Enzyme. *Brain Pathology* 20: 794-802.
- Mizushima N., Yoshimori T. (2007) How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* 3: 542-545.
- Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C (2010) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiology of Aging* 31: 224-243.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2009) Extracellular Amyloid-[beta] and Cytotoxic Glial Activation Induce Significant Entorhinal Neuron Loss in Young PS1^{M146L}/APP^{751SL} Mice. *Journal of Alzheimer's Disease* 18: 755-776.

- Morfini G, Pigino G, Szebenyi G, You Y, Pollema S, Brady ST (2006) JNK mediates pathogenic effects of polyglutamine-expanded androgen receptor on fast axonal transport. *Nat Neurosci* 9: 907-916.
- Morfini GA, You YM, Pollema SL, Kaminska A, Liu K, Yoshioka K, Bjorkblom B, Coffey ET, Bagnato C, Han D, Huang CF, Banker G, Pigino G, Brady ST (2009) Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat Neurosci* 12: 864-871.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995) Proline-directed and Non-proline-directed Phosphorylation of PHF-tau. *Journal of Biological Chemistry* 270: 823-829.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2002) Alzheimer's disease: [beta]-Amyloid protein and tau. *Journal of Neuroscience Research* 70: 392-401.
- Mrak RE, Griffin WS (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 26: 349-354.
- Mueller-Stainer S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, Wang X, Yu G, Esposito L, Mucke L, Gan L (2006) Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 51: 703-714.
- Mullan M, Mullan M (1992) Familial Alzheimer's disease: second gene locus located. *British Medical Journal* 305: 1108-1109.
- Muresan V, Varvel NH, Lamb BT, Muresan Z (2009) The cleavage products of amyloid- β precursor protein are sorted to distinct carrier vesicles that are independently transported within neurites. *The Journal of Neuroscience* 29: 3565-3578.
- Narayanan S, Reif B (2005) Characterization of chemical exchange between soluble and aggregated states of [beta]-amyloid by solution-state NMR upon variation of salt conditions. *Biochemistry* 44: 1444-1452.
- Nedelsky NB, Todd PK, Taylor JP (2008) Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1782: 691-699.
- Neely KM, Green KN, LaFerla FM (2011) Presenilin 1 is necessary for efficient proteolysis through the autophagy lysosome system in a [gamma]-secretase-independent manner. *The Journal of Neuroscience* 31: 2781-2791.
- Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruehl C (2008) Amyloid β oligomers ($A\beta_{1-42}$ globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *Journal of Neuroscience* 28: 788-797.
- Nixon RA (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 120: 4081-4091.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 64.

BIBLIOGRAFÍA

- Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, Tada M, Yanazawa M, Ito A, Akioka M, Kikuchi S, Sato M, Ideno S, Noda M, Fukunari A, Muramatsu Si, Itokazu Y, Sato K, Takahashi H, Teplow DB, Nabeshima YI, Kakita A, Imahori K, Hoshi M (2009) Isolation and Characterization of Patient-derived, Toxic, High Mass Amyloid [beta]-Protein (A[beta]) Assembly from Alzheimer Disease Brains. *Journal of Biological Chemistry* 284: 32895-32905.
- Numata K, Kaplan DL (2010) Mechanisms of Enzymatic Degradation of Amyloid [beta] Microfibrils Generating Nanofilaments and Nanospheres Related to Cytotoxicity. *Biochemistry* 49: 3254-3260.
- O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL, Eimer WA, Hitt B, Bembinster LA, Lammich S, Lichtenthaler SF, Hebert SS, De Strooper B, Haass C, Bennett DA, Vassar R (2008) Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2[alpha] Increases BACE1 Levels and Promotes Amyloidogenesis. *Neuron* 60: 988-1009.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A[beta] and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 39: 409-421.
- Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF (2006) Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur J Neurosci* 23: 251-260.
- Ohta K, Mizuno A., Ueda M., Li S., Suzuki Y., Hida Y., Hayakawa-Yano Y., Itoh M., Ohta E., Kobori M., Nakagawa T (2010) Autophagy impairment stimulates PS1 expression and [gamma]-secretase activity. *Autophagy* 6: 345-352.
- Papp H, Pakaski M, Kasa P (2002) Presenilin-1 and the amyloid precursor protein are transported bidirectionally in the sciatic nerve of adult rat. *Neurochemistry International* 41: 429-435.
- Parent AT., Thinakaran G (2010) Modeling Presenilin-Dependent Familial Alzheimer's Disease: Emphasis on Presenilin Substrate-Mediated Signaling and Synaptic Function. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2010: 1-11.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402: 615-622.
- Perez-Gracia E, Torrejon-Escribano B, Ferrer I (2008) Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer disease are deficient in cytochrome c oxidase. *Acta Neuropathologica* 116: 261-268.
- Peri F, Nessler-Volhard C (2008) Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase a1 in Phagosomal Fusion In Vivo. *Cell* 133: 916-927.
- Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ (2005) Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* 90: 663-670.
- Pigino G, Morfini G, Atagi Y, Deshpande A, Yu C, Jungbauer L, LaDu M, Busciglio J, Brady S (2009) Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *PNAS* 106: 5907-5912.

- Pigino G, Pelsman A, Mori H, Busciglio J (2001) Presenilin-1 Mutations Reduce Cytoskeletal Association, Deregulate Neurite Growth, and Potentiate Neuronal Dystrophy and Tau Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience* 21: 834-842.
- Placanica L, Zhu L, Li YM (2009) Gender- and Age-Dependent [gamma]-Secretase Activity in Mouse Brain and Its Implication in Sporadic Alzheimer Disease. *PLoS ONE* 4: e5088.
- Poirier J. (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease A Role in Amyloid Catabolism. *Ann NY Acad Sci* 924: 81-90.
- Price DL, Sisodia SS (1998) Mutant genes in familial Alzheimer's Disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* 21: 479-505.
- Price JL, Mckeel DW, Morris JC (2001) Synaptic loss and pathological change in older adults - aging versus disease? *Neurobiology of Aging* 22: 351-352.
- Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LAM, Berezovska O, Hyman BT, Chang TY, Tanzi RE, Kovacs DM (2001) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid [beta]-peptide. *Nat Cell Biol* 3: 905-912.
- Pype S, Moechars D, Dillen L, Mercken M (2003) Characterization of amyloid [beta]-peptides from brain extracts of transgenic mice overexpressing the London mutant of human amyloid precursor protein. *J Neurochem* 84: 602-609.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *PNAS* 103: 11172-11177.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JCd, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 x APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 27: 1658-1672.
- Ranaivo HR, Craft JM, Hu W, Guo L, Wing LK, Van Eldik LJ, Watterson DM (2006) Glia as a Therapeutic Target: Selective Suppression of Human Amyloid-beta-Induced Upregulation of Brain Proinflammatory Cytokine Production Attenuates Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* 26: 662-670.
- Rangachari V, Moore BD, Reed DK, Sonoda LK, Bridges AW, Conboy E, Hartigan D, Rosenberry TL (2007) Amyloid-[beta](1-42) Rapidly Forms Protofibrils and Oligomers by Distinct Pathways in Low Concentrations of Sodium Dodecylsulfate. *Biochemistry* 46: 12451-12462.
- Reiman EM, Caselli RJ (1999) Alzheimer's disease. *Maturitas* 31: 185-200.
- Resende R, Pereira C, Agostinho P, Vieira AP, Malva JO, Oliveira CR (2007) Susceptibility of hippocampal neurons to A[beta] peptide toxicity is associated with perturbation of Ca²⁺ homeostasis. *Brain Research* 1143: 11-21.

BIBLIOGRAFÍA

- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L (2003) Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Research Bulletin* 61: 1-24.
- Rodriguez J, Lazebnik Y (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development* 13: 3179-3184.
- Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR (1996) Morphology and Toxicity of A[β](1-42) Dimer Derived from Neuritic and Vascular Amyloid Deposits of Alzheimer's Disease. *Journal of Biological Chemistry* 271: 20631-20635.
- Russo C, Salis S, Dolcini V, Venezia V, Song X, Teller JK, Schettini G (2001) Identification of Amino-Terminally and Phosphotyrosine-Modified Carboxy-Terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Brain. *Neurobiology of Disease* 8: 173-180.
- Ryoo SR, Cho HJ, Lee HW, Jeong HK, Radnaabazar C, Kim YS, Kim MJ, Son MY, Seo H, Chung SH, Song WJ (2008) Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104: 1333-1344.
- Sakono M, Zako T (2010) Amyloid oligomers: formation and toxicity of A[β] oligomers. *FEBS Journal* 277: 1348-1358.
- Salvi M, Stringaro A, Brunati AM, Agostinelli E, Arancia G, Clari G, Toninello A (2004) Tyrosine phosphatase activity in mitochondria: presence of Shp-2 phosphatase in mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 2393-2404.
- Sankaranarayanan S, Holahan MA, Colussi D, Crouthamel MC, Devanarayan V, Ellis J, Espeseth A, Gates AT, Graham SL, Gregro AR, Hazuda D, Hochman JH, Holloway K, Jin L, Kahana J, Lai MT, Lineberger J, McGaughey G, Moore KP, Nantermet P, Pietrak B, Price EA, Rajapakse H, Stauffer S, Steinbeiser MA, Seabrook G, Selnick HG, Shi XP, Stanton MG, Swestock J, Tugusheva K, Tyler KX, Vacca JP, Wong J, Wu G, Xu M, Cook JJ, Simon AJ (2009) First Demonstration of Cerebrospinal Fluid and Plasma A[β] Lowering with Oral Administration of a [β]-Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1 Inhibitor in Nonhuman Primates. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 131-140.
- Scali C, Caraci F, Gianfriddo M, Diodato E, Roncarati R, Pollio G, Gaviraghi G, Copani A, Nicoletti F, Terstappen GC, Caricasole A (2006) Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiology of Disease* 24: 254-265.
- Scheff SW, Price DA (2003) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiology of Aging* 24: 1029-1046.
- Schmitz C, Rutten BPF, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HWM, Pradier L, Bayer TA (2004) Hippocampal Neuron Loss Exceeds Amyloid Plaque Load in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 164: 1495-1502.

- Schuck S, Honscho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5795-5800.
- Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK (1994) Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *PNAS* 91: 8368-8372.
- Seabrook GR, Rosahl TW (1999) Transgenic animals relevant to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 38: 1-17.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.
- Selkoe DJ (2001b) Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron* 32: 177-180.
- Sergeant N, David JP, Champain D, Ghestem A, Watzet A, Delacourte A (2002) Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology stages, in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 81: 663-672.
- Shankar GM (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-[beta] protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27: 2866-2875.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-[beta] protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14: 837-842.
- Sharples RA, Vella LJ, Nisbet RM, Naylor R, Perez K, Barnham KJ, Masters CL, Hill AF (2008) Inhibition of {gamma}-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J* 22: 1469-1478.
- Sherman MA, Lesne SE (2011) Detecting A β *56 Oligomers in Brain Tissues. In: *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia* (Roberson ED, ed), pp 45-56. Humana Press.
- Shinohara M, Sato N, Kurinami H, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M, Yamashita T, Uchiyama Y, Rakugi H, Morishita R (2010) Reduction of Brain [beta]-Amyloid (A[beta]) by Fluvastatin, a Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitor, through Increase in Degradation of Amyloid Precursor Protein C-terminal Fragments (APP-CTFs) and A[beta] Clearance. *Journal of Biological Chemistry* 285: 22091-22102.
- Shuang C, NTA, AM, Mary JL, , Warren M, , March DA (2005) Isoform-specific effects of apolipoprotein E on secretion of inflammatory mediators in adult rat microglia. *Journal of Alzheimer's Disease* 7: 25-35.
- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC (2007) Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Experimental Cell Research* 313: 2098-2109.

BIBLIOGRAFÍA

- Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC (2007) Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Experimental Cell Research* 313: 2098-2109.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39.
- Sisodia SS, George-Hyslop PH (2002) [gamma]-Secretase, notch, A[beta] and Alzheimer's Disease: Where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3: 281-290.
- Small DH (2008) Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? *Trends in Molecular Medicine* 14: 103-108.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-[beta]. *Nat Neurosci* 8: 1051-1058.
- Sobota JA, Back N, Eipper BA, Mains RE (2009) Inhibitors of the V0 subunit of the vacuolar H⁺-ATPase prevent segregation of lysosomal- and secretory-pathway proteins. *J Cell Sci* 122: 3542-3553.
- Soreghan B, Kosmoski J, Glabe C (1994) Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *Journal of Biological Chemistry* 269: 28551-28554.
- Sorensen EB, Conner SD (2010) [gamma]-Secretase-Dependent Cleavage Initiates Notch Signaling from the Plasma Membrane. *Traffic* 11: 1234-1245.
- Sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ (2008) {beta}-Amyloid1-42 Induces Neuronal Death through the p75 Neurotrophin Receptor. *Journal of Neuroscience* 28: 3941-3946.
- Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, Hyman BT (2009) Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends in Neurosciences* 32: 150-159.
- Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chioyenda P, Rossi L, Cortesi M, Cassetta E, Rossini PM (2004) Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 59: 1153-1161.
- Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC (2005) Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- α . *J Neurosci* 25: 3219-3228.
- Streit WJ (2005) Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 234-239.
- Sun X, Tong Y, Qing H, Chen CH, Song W (2006) Increased BACE1 maturation contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J* 20: 1361-1368.
- Susen K, Blöchl A (2005) Low concentrations of aggregated [beta]-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75. *Journal of Molecular Medicine* 83: 720-735.

- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446.
- Takahashi RH, Almeida CG, Kearney PF, Yu F, Lin MT, Milner TA, Gouras GK (2004) Oligomerization of Alzheimer's β -Amyloid within Processes and Synapses of Cultured Neurons and Brain. *Journal of Neuroscience* 24: 3592-3599.
- Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y (2009) γ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of β -Carboxyl Terminal Fragment. *Journal of Neuroscience* 29: 13042-13052.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) tau protein kinase I is essential for amyloid - protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7789-7793.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422: 438-441.
- Tan J, Mao G, Cui MZ, Kang SC, Lamb B, Wong BS, Sy MS, Xu X (2008) Effects of γ -secretase cleavage-region mutations on APP processing and A β formation: interpretation with sequential cleavage and β -helical model. *J Neurochem* 107: 722-733.
- Tandon A, Fraser P (2002) The presenilins. *Genome Biology* 3: reviews3014.
- Tanzi RE (2005) The synaptic A β hypothesis of Alzheimer disease. *Nat Neurosci* 8: 977-979.
- Tesco G, Koh YH, Kang EL, Cameron AN, Das S, Sena-Esteves M, Hiltunen M, Yang SH, Zhong Z, Shen Y, Simpkins JW, Tanzi RE (2007) Depletion of GGA3 Stabilizes BACE and Enhances β -Secretase Activity. *Neuron* 54: 721-737.
- Texido L, Martin-Satuq M, Alberdi E, Solsona C, Matute C (2011) Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium* 49: 184-190.
- Thangavel R, Sahu SK, Van Hoesen GW, Zaheer A (2009) Loss of nonphosphorylated neurofilament immunoreactivity in temporal cortical areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 160: 427-433.
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M (1996) Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives In Vivo. *Neuron* 17: 181-190.
- Thompson PM, Hayashi KM, de Zubicaray G, Janke AL, Rose SE, Semple J, Herman D, Hong MS, Dittmer SS, Doddrell DM, Toga AW (2003) Dynamics of Gray Matter Loss in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 23: 994-1005.
- Toei M, Saum R, Forgac M (2010) Regulation and Isoform Function of the V-ATPases. *Biochemistry* 49: 4715-4723.

BIBLIOGRAFÍA

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9): 4350-4354.
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) *Soluble Abeta Inhibits Specific Signal Transduction Cascades Common to the Insulin Receptor Pathway. Journal of Biological Chemistry* 282: 33305-33312.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) *Effects of secreted oligomers of amyloid- β protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. J Physiol (Lond)* 572: 477-492.
- Turnell WG, Finch JT (1992) *Binding of the dye congo red to the amyloid protein pig insulin reveals a novel homology amongst amyloid-forming peptide sequences. Journal of Molecular Biology* 227: 1205-1223.
- Turner RS (2001) *Alzheimer's Disease in Man and Transgenic Mice: Females at Higher Risk. The American Journal of Pathology* 158: 797-801.
- Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, Okawa K, Nishimoto T, Bito H, Ninomiya H, Sugimoto H, Kinoshita A, Shimohama S (2006) *Activity-dependent regulation of β -catenin via ϵ -cleavage of N-cadherin. Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 951-958.
- Uemura K, Kitagawa N, Kohno R, Kuzuya A, Kageyama T, Chonabayashi K, Shibasaki H, Shimohama S (2003) *Presenilin 1 is involved in maturation and trafficking of N-cadherin to the plasma membrane. Journal of Neuroscience Research* 74: 184-191.
- Uemura K, Kuzuya A, Shimozono Y, Aoyagi N, Ando K, Shimohama S, Kinoshita A (2007) *GSK3 β Activity Modifies the Localization and Function of Presenilin 1. Journal of Biological Chemistry* 282: 15823-15832.
- Valerio A, Bertolotti P, Delbarba A, Perego C, Dossena M, Ragni M, Spano P, Carruba MO, De Simoni MG, Nisoli E (2011) *Glycogen synthase kinase-3 inhibition reduces ischemic cerebral damage, restores impaired mitochondrial biogenesis and prevents ROS production. J Neurochem* 116: 1148-1159.
- Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA (2000) *Review: Alzheimer's Amyloid β -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. Journal of Structural Biology* 130: 184-208.
- Vardy ERLC, Catto AJ, Hooper NM (2005) *Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. Trends in Molecular Medicine* 11: 464-472.
- Varma S, Shrivastav A, Changela S, Khandelwal RL (2008) *Long-term effects of rapamycin treatment on insulin mediated phosphorylation of Akt/PKB and glycogen synthase activity. Experimental Cell Research* 314: 1281-1291.
- Vassar R (2001) *The β -secretase, BACE. Journal of Molecular Neuroscience* 17: 157-170.
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC (2009) *The β -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. The Journal of Neuroscience* 29: 12787-12794.

- Vela J, Gutierrez A, Vitorica J, Ruano D (2003) Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J Neurochem* 85: 368-377.
- Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *PNAS* 104: 87-92.
- Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, Wong PC, Xu H, Thinakaran G (2004) Association of γ -Secretase with Lipid Rafts in Post-Golgi and Endosome Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 279: 44945-44954.
- Vingtdeux V, Hamdane M, Bgard S, Loyens A, Delacourte A, Beauvillain JC, Buee L, Marambaud P, Sergeant N (2007) Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiology of Disease* 25: 686-696.
- Wakabayashi T, De Strooper B (2008) Presenilins: Members of the γ -Secretase Quartets, But Part-Time Soloists Too. *Physiology* 23: 194-204.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416: 535-539.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the Molecular Basis of Memory Failure in Alzheimer's Disease. *Neuron* 44: 181-193.
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ (2000) Detection of intracellular oligomers of amyloid β -protein in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39: 10831-10839.
- Walter J, Grunberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C (1997) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *PNAS* 94: 5349-5354.
- Wang R, Wang B, He W, Zheng H (2006) Wild-type presenilin 1 protects against Alzheimer's disease mutation-induced amyloid pathology. *Journal of Biological Chemistry* M512574200.
- Wattiaux R, Wattiaux-De Coninck S, Ronveaux-dupal MF, Dubois F (1978) Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J Cell Biol* 78: 349-368.
- Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R (2010) Amyloid β from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 13: 190-196.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344: 769-772.
- White JA, Manelli AM, Holmberg KH, Van Eldik LJ, LaDu MJ (2005) Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid- β 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiology of Disease* 18: 459-465.

BIBLIOGRAFÍA

- Wiltfang J, Smirnov A, Schnierstein B, Kelemen G, Matthies U, Klafki HW, Staufenbiel M, Hübner G, Rother E, Kornhuber J (1997) Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A β) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18: 527-532.
- Wolfe MS (2007) When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased A β ₄₂/A β ₄₀. *EMBO Rep* 8: 136-140.
- Wong PC, Cai H, Borchelt DR, Price DL (2002) Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 5: 633-639.
- Woods AJ, Roberts MS, Choudhary J, Barry ST, Mazaki Y, Sabe H, Morley SJ, Critchley DR, Norman JC (2002) Paxillin Associates with Poly(A)-binding Protein 1 at the Dense Endoplasmic Reticulum and the Leading Edge of Migrating Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277: 6428-6437.
- Xia W, Zhang J, Perez R, Koo EH, Selkoe DJ (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: Implications for the pathogenesis of Alzheimer Disease. *PNAS* 94: 8208.
- Xia WM (1997) Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid β -protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins. *J Biol Chem* 272: 7977-7982.
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, van Bronswijk W, Martins R (2002) Alzheimer's β -Amyloid Peptides Compete for Insulin Binding to the Insulin Receptor. *The Journal of Neuroscience* 22: RC221.
- Yamamoto A, Tagawa Y., Yoshimori T., Moriyama Y., Masaki R., Tashiro Y. (1998) Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells. *Cell Structure and Function* 23 (1): 33-42.
- Yang DS, Lee JH, Nixon RA (2009) Chapter 6 Monitoring Autophagy in Alzheimer's Disease and Related Neurodegenerative Diseases. In: *Methods in Enzymology. Autophagy in Disease and Clinical Applications, Part C* (Daniel JK, ed), pp 111-144. Academic Press.
- Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson D, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA (2011) Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* 134: 258-277.
- Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JCM (2011) Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochemistry International* 58: 321-329.
- Yatin S, Aksenova M, Aksenov M, Markesbery W, Aulick T, Butterfield D (1998) Temporal relations among amyloid β -peptide-induced free-radical oxidative stress, neuronal toxicity, and neuronal defensive responses. *Journal of Molecular Neuroscience* 11: 183-197.
- Ye S, Huang Y, Mellendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW (2005) Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells:

- ApoE structure as a potential therapeutic target. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18700-18705.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel {beta}-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171: 87-98.
- Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, Cuervo AM, Nixon RA (2004) Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for [beta]-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2531-2540.
- Zeng Z, Sarbassov DD, Samudio IJ, Yee KWL, Munsell MF, Ellen Jackson C, Giles FJ, Sabatini DM, Andreeff M, Konopleva M (2007) Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 109: 3509-3512.
- Zhang XM, Cai Y, Xiong K, Cai H, Luo XG, Feng JC, Clough RW, Struble RG, Patrylo PR, Yan XX (2009) [beta]-Secretase-1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis: implications for neuritic plaque development. *Eur J Neurosci* 30: 2271-2283.
- Zhao J, Fu Y, Yasvoina M, Shao P, Hitt B, O'Connor T, Logan S, Maus E, Citron M, Berry R, Binder L, Vassar R (2007) Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 27: 3639-3649.
- Zhao J, Fu Y, Yasvoina M, Shao P, Hitt B, O'Connor T, Logan S, Maus E, Citron M, Berry R, Binder L, Vassar R (2007) Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 27: 3639-3649.
- Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL (2008) Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 22: 246-260.
- Zhao WQ, Lacor PN, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL (2009) Insulin Receptor Dysfunction Impairs Cellular Clearance of Neurotoxic Oligomeric A{beta}. *Journal of Biological Chemistry* 284: 18742-18753.
- Zheng J, Jang H, Nussinov R (2008) [beta]2-Microglobulin Amyloid Fragment Organization and Morphology and Its Comparison to A[beta] Suggests That Amyloid Aggregation Pathways Are Sequence Specific. *Çá. Biochemistry* 47: 2497-2509.
- Zheng-Fischhofer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* 252: 542-552.

BIBLIOGRAFÍA

Zhou X, Nai Q, Chen M, Dittus JD, Howard MJ, Margiotta JF (2004) Brain-Derived Neurotrophic Factor and *trkB* Signaling in Parasympathetic Neurons: Relevance to Regulating $\alpha 7$ -Containing Nicotinic Receptors and Synaptic Function. *Journal of Neuroscience* 24: 4340-4350.

Zhu X, Lee Hg, Casadesus G, Avila J, Drew K, Perry G, Smith M (2005) Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* 31: 205-217.

Zhu X, Su B, Wang X, Smith M, Perry G (2007) Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2202-2210.

Zipp F, Aktas O (2006) The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences* 29: 518-527.

Zohar O, Pick CG, Cavallaro S, Chapman J, Katzav A, Milman A, Alkon DL (2005) Age-dependent differential expression of BACE splice variants in brain regions of tg2576 mice. *Neurobiology of Aging* 26: 1167-1175.

NOTAS

NOTAS

NOTAS