

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ROL DE LA INTERACCIÓN $A\beta$ /APP EN EL AUMENTO DE LA
CONVERGENCIA DE APP y BACE 1 INDUCIDO POR $A\beta$**

Tesinista: Antonino, Magdalena

Firma:.....

Directora: Bignante, Anahí

Firma:.....

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

INIMEC - CONICET - UNC

**ROL DE LA INTERACCIÓN A β /APP EN EL AUMENTO DE LA
CONVERGENCIA DE APP y BACE 1 INDUCIDO POR A β**

Tribunal examinador:

Nombre y apellido:..... Firma:.....

Nombre y apellido:..... Firma:.....

Nombre y apellido:..... Firma:.....

Calificación:.....

Fecha:.....

Abreviaturas

A β : Amiloide beta

AICD: Dominio intracelular del APP (Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain)

AP2: Complejo adaptador de proteína 2 (Adaptor Protein 2)

APP: Proteína Precursora del Amiloide (Amyloid Precursor Protein)

ARF 6: ADP-ribosilación factor 6 (ADP Ribosylation Factor 6)

BACE 1: Enzima que escinde a la proteína precursora del amiloide en el sitio beta 1 (Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1)

CTF: Fragmento C-Terminal (C-Terminals Fragments)

D-MEN: Medio de Eagle modificado de Dulbecco's (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMSO: Dimetil sulfóxido (DiMethyl SulfOxide)

EA: Enfermedad de Alzheimer

GGA1: Proteína uniente de Arf conteniendo el asa γ localizadora de Golgi (Golgi-localized γ -ear containing Arf binding proteins)

GPCR: Receptor acoplado a proteína G (G protein-coupled receptors)

HS: Suero de caballo (Horse Serum)

NTF: Fragmento N-Terminal (N-Terminals Fragments)

ON: Ovillos Neurofibrilares

PBS: Buffer fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)

PEI: Polietilenimina (PolyEthilimine)

PS: Placas Seniles

RE: Retículo Endoplásmico

SDS: Dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate)

SNX4: Nexina de clasificación 4 (Sorting Nexin 4)

TGN: Red Trans-Golgi (Trans-Golgi Network)

YFP: Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein)

Índice

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	2
	2.1 Objetivos	8
	2.1.1 Objetivo general.....	8
	2.1.2 Objetivos específicos	8
3	Materiales y métodos	9
	3.1 Cultivos celulares	9
	3.2 Plásmidos	9
	3.3 Anticuerpos	9
	3.4 Transfección	9
	3.5 Tratamientos.....	9
	3.6 Inmunocitoquímica	10
	3.7 Microscopía.....	10
	3.8 Análisis de colocalización	10
	3.9 Análisis estadístico	11
4	Resultados.....	12
	4.1 Determinación de la distribución intracelular de APP y BACE 1 y de su modulación por A β	12
	4.2 Determinación del rol de la interacción A β /APP sobre el tráfico y distribución intracelular de APP y BACE 1.....	16
	4.3 Determinación de la participación de la vía APP/Go en la distribución de APP y BACE	17
5	Discusión	19
6	Bibliografía	22

1. Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es considerada la patología neurodegenerativa más frecuente en la población humana de edad avanzada sin terapia efectiva. Las principales características que se observan en pacientes que poseen este trastorno incluyen deterioro progresivo de la memoria, desorden en la función cognitiva, alteraciones comportamentales como paranoia, delirios, y un decaimiento progresivo en la función del lenguaje.

En el cerebro de personas con EA se identifican dos patologías distintivas: ovillos neurofibrilares (ON), que son filamentos helicoidales intracelulares de la proteína citoesquelética tau hiperfosforilada, y placas seniles (PS), formadas por depósitos extracelulares de amiloide beta ($A\beta$). El péptido $A\beta$ es el resultado del procesamiento de una proteína de mayor tamaño, la proteína precursora de amiloide (APP). El procesamiento de APP puede seguir dos vías: una vía amiloidogénica, en la cual se produce el péptido $A\beta$, o una vía no amiloidogénica, donde se impide la formación del péptido $A\beta$. En la vía amiloidogénica, el APP es clivado por la enzima β -secretasa o BACE 1, y posteriormente por la enzima γ -secretasa. El factor limitante en la vía amiloidogénica es el clivaje de APP por BACE 1, lo cual hace que la proximidad física entre ambas proteínas sea un paso obligatorio inicial muy crítico. El compartimento celular en el que ocurre el procesamiento de APP por BACE 1 y los factores que modulan tal encuentro es aún materia de debate. Partiendo de hallazgos que describen que el $A\beta$ es capaz de inducir su propia secreción, generando un mecanismo de retroalimentación positiva, nos interesó dilucidar si esto ocurría a través de un aumento en el encuentro entre APP y BACE 1 en un compartimento amiloidogénico. De ser así, nos interesa indagar si tal efecto es dependiente de la interacción entre $A\beta$ y APP; y/o de la vía de señalización activada por tal interacción mediada por Go/G $\beta\gamma$.

Descubrimos que, inicialmente, APP y BACE 1 tienen una baja colocalización que aumenta después de un tratamiento de 24 hs con $A\beta$ 10 μ M, como resultado de una redistribución de APP y BACE 1 en el endosoma de reciclaje. Luego, evaluamos si el cambio observado en la expresión de APP y BACE 1, como consecuencia del tratamiento con $A\beta$, depende de la interacción entre este último y el APP de membrana. Para ello, utilizamos una forma deletada de APP llamada APP $\Delta\beta$ y hallamos que se requiere de la interacción de $A\beta$ con APP para que el cambio en la distribución de APP y BACE 1 inducido por $A\beta$ ocurra. Por último, evaluamos la participación de la vía APP/Go/ $\beta\gamma$ en la distribución de APP y BACE 1 y pudimos determinar que la misma tiene participación en la redistribución y aumento de convergencia de APP y BACE 1 inducida por $A\beta$, ya que un inhibidor farmacológico del complejo $\beta\gamma$, galeína, lo impide.

En conjunto, estos resultados sugieren que el $A\beta$ exógeno induce un cambio en la expresión de APP y BACE 1 que conduce a un aumento de la colocalización de ambas proteínas en endosomas de reciclaje, determinado por la cascada de señalización activada por la unión del $A\beta$ a su receptor, el APP, activando la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Go.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer – APP – BACE 1 – $A\beta$ – Endosomas de reciclaje – Amiloidogénesis.

2. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es considerada la patología neurodegenerativa más frecuente en la población humana de edad avanzada que carece de terapia efectiva (Bignante y col., 2013). Se define como un trastorno neurodegenerativo progresivo, caracterizado por alteraciones cognitivas, funcionales y comportamentales (Cummings y col., 2018).

Las principales características que se observan en pacientes que poseen este trastorno incluyen deterioro progresivo de la memoria, desorden en la función cognitiva, alteraciones comportamentales como paranoia, delirios, y un decaimiento progresivo en la función del lenguaje. Durante las fases tempranas y media de este proceso, el estado de alerta del paciente se encuentra bien conservado; y las funciones sensoriales y motoras aún permanecen intactas. Sin embargo, a medida que avanza la enfermedad, disminuyen las funciones motoras como la marcha y la coordinación (Selkoe, 2001).

En 1907, el Dr. Alzheimer reportó la presencia de dos patologías distintivas en el cerebro de personas enfermas: ovillos neurofibrilares (ON) y placas seniles (PS) (O'Brien y Wong, 2011). Los ON consisten en filamentos helicoidales intracelulares de la proteína citoesquelética tau hiperfosforilada. Las PS están formadas fundamentalmente por depósitos extracelulares de un péptido de 40-43 aminoácidos, llamado amiloide beta ($A\beta$), anormalmente plegado y agregado (Braak y Braak, 1986; Greenfieldy col., 1998).

Desde el año 2002 y hasta la actualidad, ha tomado importancia la "hipótesis del amiloide", en la cual se propone que la acumulación de $A\beta$ en el cerebro es la principal influencia que impulsa la patogénesis de EA. De manera que, el resto de los procesos de la enfermedad, serían una consecuencia de la deposición de $A\beta$, que se sugiere ocurre por un desbalance entre su producción y su metabolismo (Hardy y Selkoe, 2002). Particularmente, esta hipótesis propone que las formas genéticas de EA de inicio temprano, poseen mutaciones en los genes del APP o de la presenilina 1 o 2, lo cual provoca un aumento en la producción o velocidad de deposición del $A\beta$ a lo largo de la vida del individuo. Mientras que en las formas esporádicas de inicio tardío de la enfermedad, existen fallas en los mecanismos de eliminación del $A\beta$ que generan un aumento gradual de los niveles del mismo en el cerebro. Independientemente de cual sea la causa, el $A\beta$ se acumula progresivamente en cortezas límbicas y de asociación y provoca efectos nocivos sobre la eficacia sináptica, induce activación microglial y astrocítica, así como también respuestas inflamatorias; lo cual altera la homeostasis iónica neuronal y causa lesión oxidativa. Además, las actividades alteradas de quinasas/fosfatasa conducen a la formación de ON. La disfunción neuronal/sináptica generalizada y la pérdida neuronal selectiva con déficits de neurotransmisores conllevan a la demencia (Figura 1) (Selkoe y Hardy, 2016).

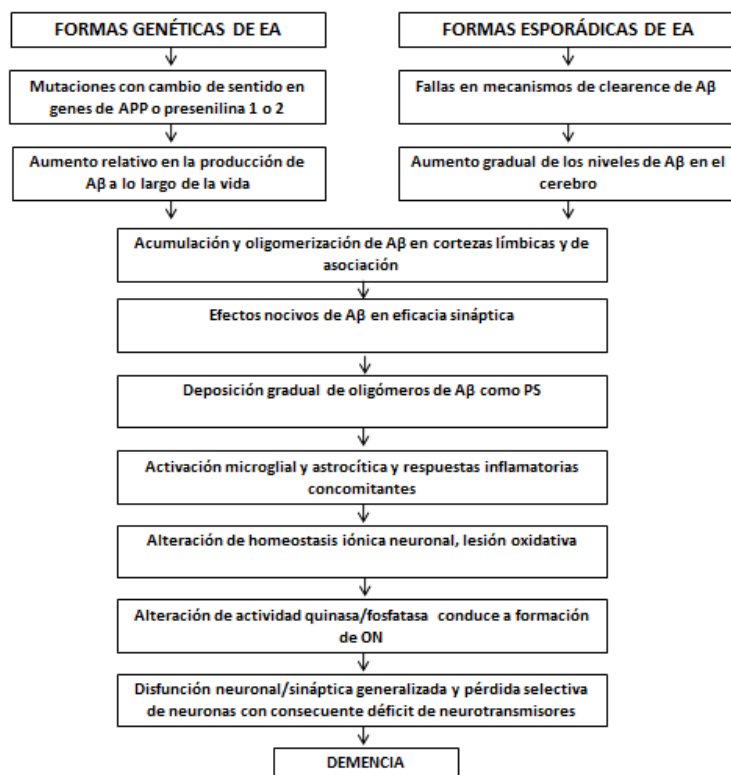


Figura 1: Hipótesis de la cascada del amiloide. Secuencia de eventos patogénicos principales que conducen a EA propuesta por la hipótesis de la cascada amiloide (Adaptada de Selkoe y Hardy, 2016).

Las lesiones histopatológicas que se observan en la EA presentan un patrón de distribución temporal y espacial característico. En los casos más levemente afectados de la enfermedad, los ON se encuentran confinados a la región transentorrinal. Posteriormente, en un estadio intermedio, comienzan a afectar regiones límbicas como la formación hipocámpal, la amígdala, tálamo, hipotálamo, núcleos septales. En estadios finales de la enfermedad, todas las áreas de asociación neocortical se encuentran afectadas. En el caso de las PS, al comienzo de la enfermedad se depositan en la neocorteza, particularmente en las regiones basales de los lóbulos frontal, temporal y occipital. Luego se encuentran presentes en casi todas las áreas de la neocorteza, quedando libres sólo áreas sensoriales y motoras primarias. En la última etapa, básicamente todas las áreas de la neocorteza se encuentran afectadas (Figura 2) (Braak y Braak, 1990; Braak y Braak 1991; Arnold y col., 1991). Se ha propuesto que ocurre una transmisión transináptica de la agregación de Aβ que sustentaría la deposición progresiva a través de circuitos neuronales establecidos, sin embargo, la base mecánica de tal proceso no se ha dilucidado (Harris y col., 2010).

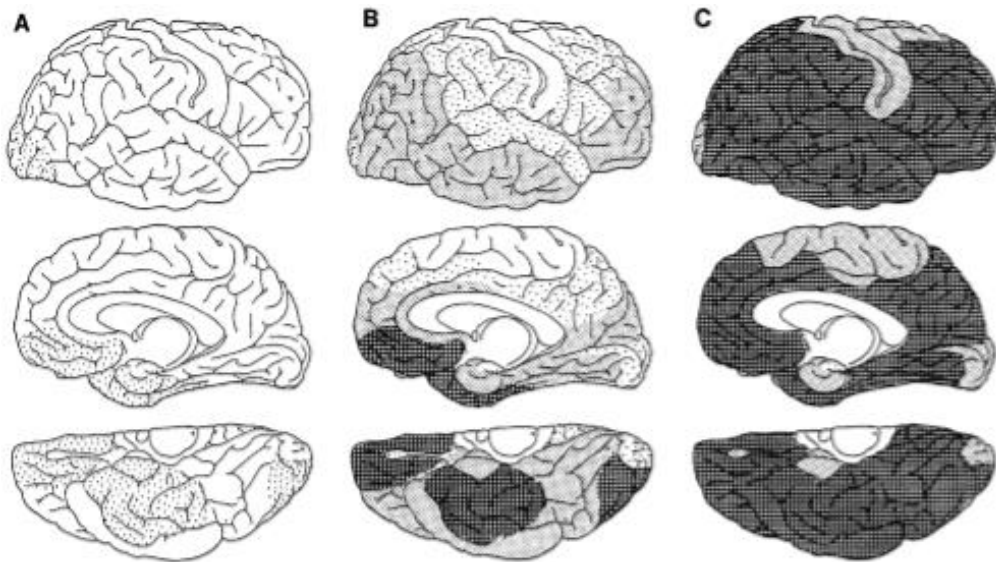


Figura 2: Patrón de distribución de las PS. La distribución de las PS se puede representar en tres etapas. Etapa A, los depósitos iniciales se pueden encontrar en porciones basales de la isocorteza. Etapa B, muestra amiloide en prácticamente todas las áreas de asociación isocortical. La formación del hipocampo sólo está levemente involucrada. Etapa C, en la etapa final, los depósitos se pueden ver en todas las áreas de la isocorteza, incluidos los campos centrales sensoriales y motores. El aumento de la densidad de sombreado indica un aumento en el número de depósitos de amiloide (Extraído de Braak y Braak, 1991).

El péptido A β es el resultado del procesamiento de una proteína de mayor tamaño, la proteína precursora de amiloide (APP), la cual es una proteína transmembrana de tipo I que posee una larga cola extracelular (O'Brien y Wong, 2011). Después de la síntesis de proteínas en los polisomas asociados a retículo endoplasmático (RE), el APP es N-glicosilado en el RE y luego se transporta al Golgi para la O- y N-glicosilación, fosforilación y sulfonación en los sitios de tirosina (Sun y Roy, 2018). Se han descrito varias funciones como modular el crecimiento celular, la motilidad, el crecimiento de neuritas y la supervivencia celular, entre otras (O'Brien y Wong, 2011).

El procesamiento de APP puede seguir dos vías: una vía amiloidogénica, en la cual se produce el péptido A β , o una vía no amiloidogénica, donde se impide la formación del péptido A β (Figura 3). En la vía amiloidogénica, el APP presente en la membrana plasmática es reinternalizado en vesículas asociadas a clatrina a compartimentos endosomales, donde es clivado por la enzima β -secretasa y posteriormente por la enzima γ -secretasa (O'Brien y Wong, 2011). La β -secretasa escinde al APP en el extremo N-terminal del A β para liberar sAPP β , un fragmento N-terminal (NTF) soluble de 100 kD, y C99, un fragmento C-terminal (CTF) de 12 kD, que permanece unido a la membrana. Posteriormente, el fragmento C99 es clivado por la γ -secretasa, lo que da como resultado A β , que es vertido en el espacio extracelular (Vassar y col., 1999; O'Brien y Wong, 2011). En la vía no amiloidogénica, el APP puede ser proteolizado directamente en la superficie celular por la enzima α -secretasa y luego por la enzima γ -secretasa. La α -secretasa escinde al APP dentro de la secuencia de A β , liberando al espacio extracelular un gran NTF soluble, sAPP α , y un CTF de 10 kD, C83, que permanece unido a la

membrana y posteriormente es clivado por la γ -secretasa, liberando el péptido p3. La γ -secretasa no sólo produce la liberación de $A\beta$ y p3, sino que también produce la liberación del dominio intracelular de APP (AICD) al citosol. (Vassar y col., 1999; Selkoe, 2001; O'Brien y Wong, 2011; Haass y col., 2012; Vassar y col., 2014).

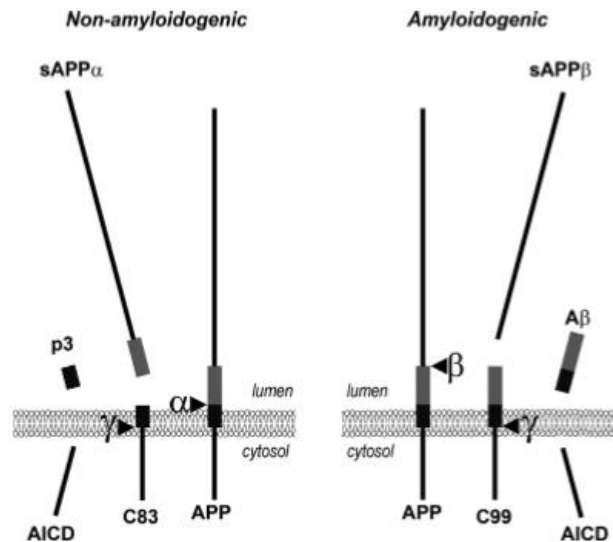


Figura 3: Vías de procesamiento metabólico del APP. El APP es una proteína transmembrana metabolizada por dos rutas mutuamente excluyentes: vía no amiloidogénica (izquierda), donde es clivado por una enzima α -secretasa y consecuentemente por una γ -secretasa, y vía amiloidogénica (derecha), donde el corte primero por una β -secretasa, (BACE 1) y luego por una γ -secretasa produce el $A\beta$ (Extraído de Bignante y col., 2013).

La enzima β -secretasa es conocida como BACE 1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme 1), una proteína transmembrana tipo I. Su dominio catalítico posee dos motivos aspartil proteasa que forman el sitio activo, el cual se encuentra en el lado luminal de la membrana, donde β -secretasa escinde al APP. Está altamente concentrada en las neuronas y su actividad enzimática es óptima a pH ácidos (Yan y Vassar, 2014). Es sintetizada en el RE, donde también sufre una serie de modificaciones como la glicosilación, luego se transporta al aparato de Golgi y desde allí puede transportarse a compartimentos endosomales o a la membrana plasmática (MP), donde también puede ser reinternalizada por endosomas. Este transporte es regulado por el motivo intracitoplasmático dileucina, en el extremo C-terminal (Huse y col., 2000; Pastorino y col., 2002).

La producción de $A\beta$ requiere la internalización de APP y BACE 1. La endocitosis de APP se realiza bajo un mecanismo dependiente de clatrina (Das y col., 2013), mientras que la internalización de BACE 1 a endosomas está acoplada a dos mecanismos excluyentes. Una vía está controlada por la GTPasa ADP Rybosilation Factor 6 (ARF6), la cual se localiza en la membrana plasmática y en los compartimentos endosomales (Sannerud y col., 2011), la otra vía es dependiente de clatrina y mediada por Adaptor Protein 2 (AP2), para una internalización rápida (Prabhu, 2012; Chia, y col., 2013). Además, hay dos diferentes sistemas que transportan a BACE 1 desde los endosomas tempranos hacia los endosomas de reciclaje: una vía mediada por Sorting Nexin 4 (SNX4) y una vía mediada por Golgi-localized γ -ear containing Arf binding proteins (GGA1) y el retromero. La vía SNX4 no se basa en señales de clasificación específicas y

puede transportar BACE 1 fosforilado o no fosforilado con la misma eficiencia e involucra la partición de BACE 1 en túbulos de transporte promovidos por las propiedades físicas del SNX4. En la vía mediada por GGA1 y el retromero, el adaptador GGA1 reconoce el motivo DISLL fosforilado de BACE 1 y el retromero impulsa la tubulación y la formación de transportadores para promover el transporte rápido de la BACE 1 a los endosomas de reciclaje (Toh y col., 2017). Es interesante notar que tanto APP como BACE 1 presentan un tráfico intenso, el cual está regulado a distintos niveles por su estado de fosforilación o el de sus adaptadores, por lo que indagar en vías de señalización que puedan modular este aspecto tendría impacto en la modulación de su tráfico y eventualmente en la amiloidogénesis.

El factor limitante en la vía amiloidogénica es el clivaje de APP por BACE 1, lo cual hace que la proximidad física entre ellos sea un paso obligatorio inicial muy crítico (Das y col., 2013; Sun y Roy. 2018). Se sabe que en la vía no amiloidogénica, el procesamiento de APP por α -secretasa ocurre en la membrana plasmática (Lammich y col., 1999), sin embargo, el compartimento celular en el que ocurre el procesamiento de APP por BACE 1 es materia de debate. Numerosos estudios sugieren que APP y BACE 1 colocalizan en la superficie celular y luego son internalizados juntos en endosomas tempranos (Kinoshita y col., 2003; Sannerud y col., 2011). Por otra parte, hallazgos obtenidos por Das y colaboradores (2016) muestran que APP y BACE1 colocalizan en endosomas de reciclaje distribuidos en espinas dendríticas y botones presinápticos de neuronas hipocampales. Por el contrario, en los axones estas proteínas se cotransportan en vesículas derivadas de Golgi e interactúan en estos orgánulos. Según resultados de otro grupo, el péptido A β se produce en la Red Trans Golgi (TGN por sus siglas en inglés) (Kinoshita y col., 2003) como resultado del transporte retrógrado de APP desde los endosomas tempranos, recuperado de la superficie celular (Choy y col., 2012). Estas discrepancias pueden tener su origen en diferencias en el sistema experimental usado, y ponen de relevancia que el sitio exacto de encuentro entre APP y BACE 1 en estado basal aún es materia de debate. Dilucidar este aspecto sería de gran importancia para entender el proceso de amiloidogénesis y tratar de intervenirlo.

Se ha visto que existe una relación dinámica producto/precursor entre el A β y el APP, donde el A β incrementa los niveles de APP en la superficie celular reduciendo su tasa de degradación, lo que resulta en su acumulación (Heredia y col., 2004). Por otro lado, Davis-Salinas y colaboradores (1995) afirman que en cultivos de células musculares lisas, A β 1-42 podría inducir un incremento en la producción del péptido A β . Posteriormente, en otro estudio se demostró que el efecto proamiloidogénico del A β también ocurre en cultivos neuronales (Mardsen y col., 2011). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que exista un mecanismo de retroalimentación positiva tóxica en la producción de A β que podría estar relacionada a la deposición de A β . Sin embargo, la base mecanística que subyace a estos eventos aún no se conoce, por ejemplo, si este efecto depende de una redistribución y/o aumento en la convergencia entre APP y BACE 1. A partir de ello, uno de los aspectos que nos interesa explorar en el laboratorio es si el efecto estimulador de la amiloidogénesis inducido por A β implica la participación de APP como receptor de sus formas agregadas, más allá de su rol como precursor; y/o de un cambio en la expresión y distribución intracelular de APP y BACE 1.

Existen reportes que indican que el APP actúa como un receptor de membrana para el A β , y que el sitio de interacción sería su secuencia homóloga yuxtamembrana en el dominio

extracelular (Shaked y col., 2006; Sola Vigo y col., 2009). Un trabajo posterior demostró que la sobreexpresión de la forma mutante de APP, APP $\Delta\beta$, que tiene deletionados los aminoácidos 597-624, pierde su capacidad de unirse al A β y carece de varios de los efectos neurotóxicos atribuidos a la sobreexpresión del APP wt (Kedikian y col., 2010; Figura 4). Por otro lado, se ha propuesto al APP como un receptor acoplado a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) que interacciona con la proteína heterotrimérica Go (Nishimoto y col., 1993; Bignante y col., 2013). En neuronas maduras de hipocampo, APP y la proteína Go α interactúan físicamente, y esta interacción incrementa, con la deposición de A β , en neuritas distróficas. Además, se observó que la sobreexpresión de APP genera que las neuronas de hipocampo sean más vulnerables a la toxicidad del A β (Sola Vigo y col., 2009). Asimismo, utilizando galeina, un inhibidor farmacológico del complejo $\beta\gamma$ de la proteína Go, se demostró que este efecto y otros asociados a la toxicidad de A β , como la distrofia neurítica, disminución de componentes sinápticos e hiperfosforilación de tau, son mediados por la activación de la vía APP/Go/ $\beta\gamma$. Además, se pudo determinar que la distrofia neurítica y la reducción de la viabilidad neuronal inducidos por A β dependen de la activación de p38-MAPK, cascada debajo de la vía APP/Go/ $\beta\gamma$ (Bignante y col., 2018). Indagar si esta vía de señalización tiene algún rol en la distribución intracelular de APP y BACE 1, sería de gran utilidad para entender algunos aspectos de la amiloidogénesis y tratar de intervenirla.



Figura 4: Expresión del constructo de APP. Representación esquemática de la proteína de APP humana completa (APP) y la mutante de APP deletionado (APP $\Delta\beta$). Se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente de la delección (numeración APP695). La secuencia de A β yuxtamembrana se indica en gris claro. (Adaptado de Kedikian y cols., 2010).

A partir de todo lo expuesto, la **hipótesis** planteada es que *el péptido A β modifica la distribución intracelular de APP y BACE 1 y ese efecto es dependiente de la interacción de A β con APP. Nuestra predicción es que el tratamiento con A β aumentará la convergencia de APP y BACE 1 en cierto compartimento celular, inducido por la interacción A β /APP y su consecuente señalización vía Go/ $\beta\gamma$.*

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue dilucidar algunos aspectos relacionados a la modulación de la amiloidogénesis. Particularmente, describir cómo el A β es capaz de inducir su propia secreción, alterando la distribución intracelular de las proteínas implicadas en el primer corte amiloidogénico, APP y BACE 1, dónde ocurre físicamente ese evento y cómo puede modularse.

2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Analizar por microscopía el efecto de A β sobre el tráfico y distribución intracelular de APP y BACE 1.

A partir de un trabajo anterior, encontramos que el tratamiento con A β era capaz de aumentar la convergencia de APP con BACE 1 (Tesis del biólogo Leandro Freitas, año 2017). En este trabajo, tratamos de evaluar dónde ocurre físicamente esa colocalización. Empleamos células HELA transfectadas con cDNA de APP-GFP, BACE 1-Cherry y posteriormente inmunoteñidas con marcadores de sistema endosomal o Golgi. Por microscopía y análisis de colocalización cuantitativa, pudimos caracterizar la localización subcelular de APP y BACE 1 bajo condiciones basales y bajo el tratamiento con A β . De esta forma, pudimos poner en evidencia si el A β induce una alteración del tráfico de las proteínas relacionadas a la amiloidogénesis redistribuyéndolas en determinado compartimento subcelular, disparando así un mecanismo de retroalimentación positiva incrementando su propia producción.

2- Analizar el rol de la interacción A β /APP sobre el tráfico y distribución intracelular de APP y BACE 1.

Para este objetivo, se utilizó una forma delecionada de APP que carece del sitio de interacción con A β (APP $\Delta\beta$). Pudimos determinar si la deposición de A β es capaz de alterar la distribución de APP $\Delta\beta$ y BACE 1, de la misma forma que cuando se expresa el APP wild type.

3- Analizar el rol de la vía de señalización activada por A β y mediada por APP/Go, sobre el cambio en la distribución de APP y BACE 1 inducida por A β .

Utilizando un inhibidor farmacológico del complejo $\beta\gamma$, galeina, para bloquear la señalización mediada por APP/Go activada por A β , estudiamos si esta vía tiene participación en la redistribución y aumento de convergencia de APP y BACE 1 inducida por A β .

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivos celulares

Se emplearon las líneas celulares HELA, estas son células de origen epitelial, derivadas de cáncer cérvico-uterino. Las células fueron sembradas en placas de 35 mm o de 60 mm y mantenidas en medio D-MEN (Gibco, N. Y., EEUU.) suplementado al 10% con suero fetal bovino (Gibco, N. Y., EEUU) y los antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco, N. Y., EEUU). Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 37 °C en una atmósfera saturada de humedad y al 5% de CO₂.

3.2 Plásmidos

Para la transfección, los plásmidos utilizados fueron: pEYFP-N3 (Clontech, California, EEUU) que contiene la secuencia que codifica la proteína fluorescente amarilla (YFP), APP-GFP, que contiene al APP fusionado a la proteína fluorescente verde (elaborado en nuestro laboratorio), BACE 1-Cherry (constructo cedido gentilmente por el Dr. Roy) que contiene la β -secretasa fusionada a la proteína fluorescente cereza y APP $\Delta\beta$ -GFP, que contiene al APP que carece del dominio extracelular del A β en el APP, fusionado a la proteína fluorescente verde (generado en nuestro laboratorio, Sola Vigó y cols., 2009).

3.3 Anticuerpos

Para los ensayos de inmunocitoquímica se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-Rab11 (Termofisher, Massachusett, EEUU), que reconoce proteínas Rab11 ubicadas en endosomas de reciclaje, anticuerpo monoclonal anti-GM130 (BD Bioscience, Nueva Jersey, EEUU), que reconoce proteínas GM130 del aparato de Golgi. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: AlexaFluor 633 (Jackson, Pensilvania, EEUU).

3.4 Transfección

Los cultivos celulares se desarrollaron en placas de 35 mm o 60 mm hasta alcanzar un 80 % de confluencia. Los cultivos en placas de 35 mm fueron cotransfectados con la siguiente mezcla: ADN de interés (0,75 μ g de APP-GFP o APP $\Delta\beta$ -GFP y 0,5 μ g BACE 1-Cherry), 125 μ L de NaCl 0,15 M y 3 μ L de polietilenimina 87K (PEI, fabricado y vendido por el Dr. Martínez, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). Para las placas de 60 mm se utilizó el doble de cantidad. La preparación se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego fue incorporada a las placas. Las células fueron fijadas 24 horas post-transfección por incubación durante 20 minutos en una solución de paraformaldehído al 4 %. En paralelo se realizó una transfección con YFP, NaCl y PEI, para control de transfección.

3.5 Tratamientos

Para los tratamientos con el péptido A β se utilizaron péptidos sintéticos comerciales que corresponden al fragmento 25-35 del péptido completo. Este péptido es usado extensamente por tener mayor potencia neurotóxica que el A β 1-40 o A β 1-42 (Biopeptide Co, San Diego, EEUU). Se diluyeron 100 μ g del fragmento A β 25-35 en 100 μ L de agua bidestilada estéril. Dicha preparación permaneció en incubación durante 24 horas a 37 °C. Al día siguiente, se incorporó

a la mezcla 100 μ L de PBS 2X; esto consistió en la solución madre de concentración 500 mM. Posteriormente, se incorporó a los cultivos una hora luego de la transfección para alcanzar una concentración final de 20 μ M. Para los cultivos tratados con galeina, se incorporó 2,4 μ L de galeina al 10% en agua en el medio de cultivo, para una concentración final de 5 μ M.

3.6 Inmunocitoquímica

Los cultivos celulares fueron fijados con paraformaldehído al 4 % en PBS/sucrosa a 37 °C durante 20 minutos. Luego de ser fijados, se realizaron tres lavados con PBS 1X. Para la permeabilización, los cultivos celulares fueron tratados con Tritón X-100 0,2 % en PBS durante cinco minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS 1X. Luego, los cultivos fueron bloqueados con suero de caballo (HS, por sus siglas en inglés) al 5 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Nuevamente, los cultivos fueron lavados con PBS y luego se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (anti-Rab11, 1:50 Thermo Fisher y anti-GM130, 1:50 BD Bioscience), disuelto previamente en HS al 1 % en PBS durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, los cultivos fueron sometidos a cinco lavados de cinco minutos con PBS 1X, y posteriormente, fueron incubados con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo o anti-ratón respectivamente, AlexaFluor 633, 1:500 Jackson) disuelto en HS al 1 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente y cubiertos de la luz. Al finalizar la incubación, se realizaron cinco lavados con PBS 1X a los cultivos y luego fueron montados en un portaobjetos con 7 μ L de FluorSave (Sigma Aldrich, San Luis, EEUU). Los preparados fueron observados en un microscopio confocal de fluorescencia (LSM800, Olympus) con un objetivo de 60X de magnificación.

3.7 Microscopía

La proteína GFP fue excitada con la línea de 509 nm de láser de 488 nm y su emisión fue colectada con un filtro de 400-550 nm. La proteína Cherry, fue excitada con la línea de 610 nm, láser de 561 y filtro de 400-630 nm. Para el caso de Alexa 633, fue excitado con la línea de 647 nm, láser de 640 nm y filtro de 650-700 nm. La potencia de los láseres de 488, 561 y 640 nm fue de 4,2; 1,6 y 5 %. La potencia del láser y la apertura del pinhole se eligieron de manera tal que no sature la emisión de fluorescencia y se pueda ver lo deseado. Para separar la luz del láser de excitación/fluorescencia de las proteínas, se utilizó un dicroico. Las imágenes fueron tomadas de a un canal por vez.

Los preparados fueron observados en un microscopio confocal de fluorescencia (LSM800, Zeiss) con un objetivo de 60X de magnificación (Plan Aplanachromat Zeiss), en aceite de inmersión y con apertura numérica de 1,42. El mantenimiento periódico del microscopio permite prevenir los posibles artefactos, como por ejemplo, que los láseres no converjan en el mismo punto de la célula, lo cual significaría un error en la cuantificación de la colocalización observada.

3.8 Análisis de colocalización

A los fines de realizar un análisis de colocalización cuantitativo, se realizaron Stacks con 0,45 μ m de separación entre las fetas ópticas. El análisis se realizó sobre la feta óptica medial que presentaba la mejor distribución de APP y BACE 1. Las imágenes obtenidas fueron procesadas

y analizadas utilizando el programa Fiji. Inicialmente, a todas las imágenes se les sustrajo el ruido de fondo automáticamente. Utilizando un ROI, se analizó la superficie completa de cada célula y se corrió el plugin *Colocalization Thresholds*, a través del cual se pudieron obtener los coeficientes de Manders, que permiten definir la colocalización entre marcas (Bignante y cols., 2018). Además, utilizando dicho plugin, se obtuvieron mapas de colocalización, donde se solapa la marca de ambas proteínas analizadas y el sitio donde colocalizan se observa en color amarillo. A los fines ilustrativos, algunas imágenes poseen un pseudocolor que fue editado con el programa Fiji y está indicado en cada figura.

3.9 Análisis estadístico

Los datos fueron comparados estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANAVA) de una vía, seguido de comparaciones post hoc con el test LSD, en los casos necesarios.

4. Resultados

4.1 Determinación de la distribución intracelular de APP y BACE 1 y de su modulación por A β

Para determinar el efecto de A β sobre el tráfico y distribución intracelular de APP y BACE 1, se realizaron cultivos de células HELA en vidrios de 12 mm (700.000 células HELA en placas de 60 mm). Al día siguiente, los cultivos fueron cotransfectados con APP-GFP y BACE 1-Cherry. Luego, fueron tratados con A β 10 μ M o con vehículo y 24 horas después fueron fijados con paraformaldehído al 4 %. Posteriormente, se realizó el procedimiento de inmunocitoquímica para endosomas de reciclaje y Golgi utilizando anticuerpo monoclonal primario anti-Rab11 y anti-GM130 y anticuerpo secundario Alexa 633. Los vidrios fueron montados en un portaobjetos y observados con microscopía confocal con magnificación de 60X. Se tomaron imágenes que fueron analizadas con el programa Fiji. De esta manera, se podrá analizar si el A β aumenta la colocalización de APP con BACE 1 por redistribuir a APP y a BACE 1 en endosomas de reciclaje o al aparato de Golgi.

La figura 4.1.1 representa la distribución de APP y BACE 1 en condiciones basales. La distribución de APP es ubicua y reticular, presentándose gran cantidad en el aparato de Golgi, mientras que BACE 1 presenta una distribución más vesicular.

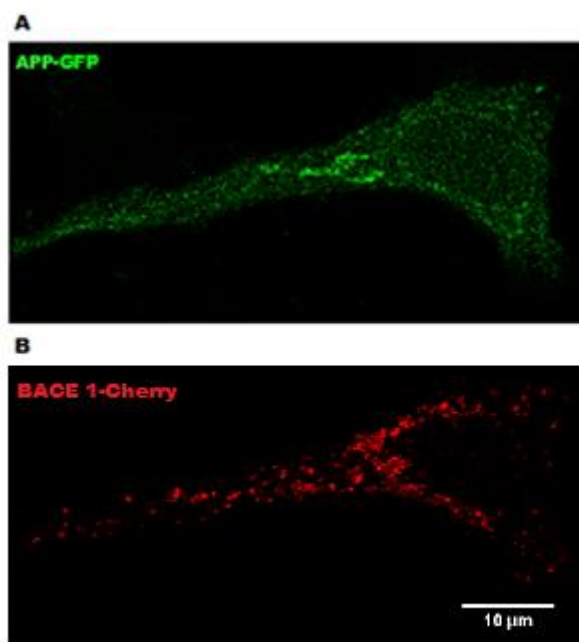


Figura 4.1.1: Distribución de APP-GFP y BACE 1-Cherry.

En la Figura 4.1.2 se observa que en condiciones basales, la marca de APP-GFP colocaliza en baja proporción con la marca de BACE 1-Cherry, mientras que con el tratamiento con A β se observa un aumento en la colocalización de ambas proteínas. Este resultado, confirma los hallazgos de Leandro Freitas, que describen el aumento de convergencia de APP y BACE 1 bajo el tratamiento con A β . El análisis de los porcentajes de colocalización indica que el $35,9 \pm 4,7$ %

del APP-GFP colocaliza con BACE 1-Cherry en la condición basal, y aumenta al $59,9 \pm 5,3 \%$ con el tratamiento con $A\beta$ $10 \mu M$ (ANOVA de una vía ($F_{1,16}$)= $11,5540$; $p=0,0037$). Además, el $31,5 \pm 5,8 \%$ de BACE 1-Cherry colocaliza con APP-GFP en condición basal, y aumenta a $51,9 \pm 6,4 \%$ bajo tratamiento con $A\beta$ $10 \mu M$ (ANOVA de una vía ($F_{1,16}$)= $5,5473$; $p=0,03160$). Debido a que la colocalización de APP-GFP con BACE 1-Cherry es modulada en el mismo sentido que la de BACE 1-Cherry con APP-GFP en todos los casos, usaremos sólo una (% de APP-GFP colocalizando con BACE 1-Cherry) a los fines de simplificar la interpretación.

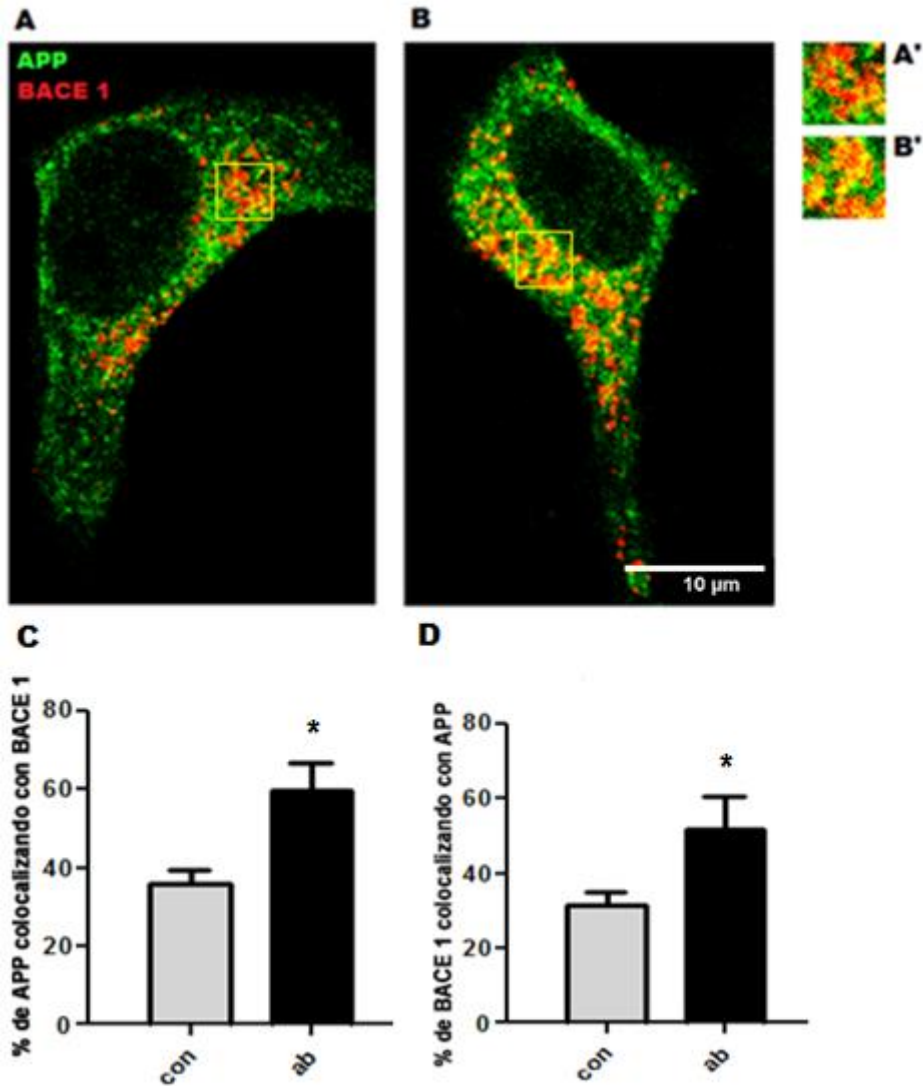


Figura 4.1.2: Efecto del tratamiento con $A\beta$ $10 \mu M$ sobre la distribución de APP-GFP y BACE 1-Cherry. En las figuras siguientes, se incluyeron los nombres de los tratamientos identificados con color dentro de la misma figura. Imagen de pseudocolor donde se observa el grado de colocalización de APP-GFP con BACE 1-Cherry en A) condición basal (con) y B) bajo tratamiento con $A\beta$. A' y B') corresponden al detalle de las imágenes A y B, respectivamente. C y D) Cuantificación del grado de colocalización de las proteínas analizadas a través de la obtención de los coeficientes de Manders. ($n=11$) * $p \leq 0,05$.

En la figura 4.1.3, se puede observar que la marca de APP-GFP, que se distribuye de forma ubicua, tiene bajo grado de colocalización con la inmunomarcación de Rab11 en el estado basal, y que la marca de BACE 1-Cherry, distribuida en forma vesicular, colocaliza en moderada proporción con la marcación de Rab11. Sin embargo, bajo el tratamiento con A β se observa que aumenta la colocalización de ambas proteínas con Rab11.

Los resultados estadísticos muestran que en condiciones basales el $32,9 \pm 0,1$ % de APP colocaliza con Rab11 en cultivos tratados con vehículo y que bajo tratamiento con A β la colocalización aumenta a $48,0 \pm 0,1$ % (Figura E, ANAVA: $F(1,21)=4,7943$; $p=0,0399$). Por otra parte, BACE 1 colocaliza con Rab11 en un $38,30 \pm 0,04$ % en condición basal y aumenta a $56,0 \pm 0,1$ % bajo tratamiento con A β (Figura F) (ANAVA $F(1,25)=11,878$ $p=0,0020$).

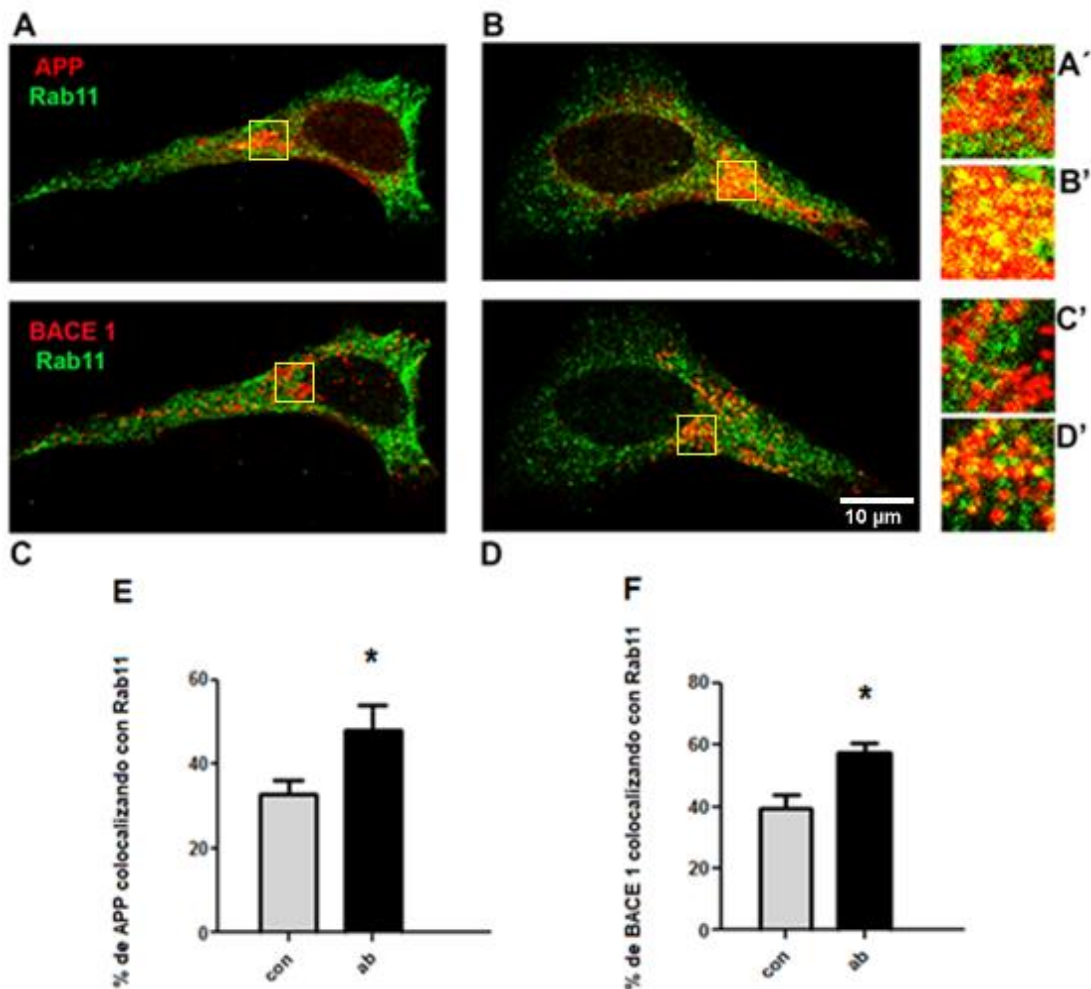


Figura 4.1.3: Efecto del tratamiento con A β 10 μ M sobre la distribución de APP-GFP y BACE 1-Cherry en endosomas de reciclaje. Se transfectaron células HELA en cultivo con APP-GFP y BACE 1-Cherry y luego se inmunotizó con anticuerpo anti-Rab11 (marcador de endosomas de reciclaje). Imagen de pseudocolor donde se observa el grado de colocalización de APP con Rab 11 en A) condición control (tratamiento con vehículo) y B) bajo tratamiento con A β . Imagen de pseudocolor donde se observa el grado de colocalización de BACE 1 con Rab11 en C) condición basal y D) bajo tratamiento con A β . A', B', C' y D') corresponden al detalle de las imágenes A, B, C y D, respectivamente. E y F) Cuantificación del

grado de colocalización de las proteínas analizadas a través de la obtención de los coeficientes de Manders. (n=11) * $p \leq 0,05$.

Las fotografías de inmunocitoquímica de la figura 4.1.4, muestran que en condiciones basales tanto APP-GFP como BACE 1-Cherry colocalizan en baja proporción con el anticuerpo GM130. Bajo el tratamiento con $A\beta$, se observa un aumento en la colocalización de APP-GFP con GM130, sin embargo, no se observan diferencias, respecto a la condición control, de la colocalización de BACE 1-Cherry con GM130.

El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas reveló que el $43,1 \pm 0,1$ % de APP colocaliza con GM130 en condiciones basales y que bajo el tratamiento con $A\beta$ la colocalización aumenta a $64,13 \pm 0,1$ % (ANOVA $F(1,16)=7,3142$; $p=0,0156$). En el caso de BACE 1, se observó que en cultivos tratados con vehículo, la colocalización de esta proteína con GM130 es de $31,7 \pm 0,4$ %, y que bajo el tratamiento con $A\beta$ no generó cambios (ANOVA $F(1,16)=0,008$ $p=0,9777$).

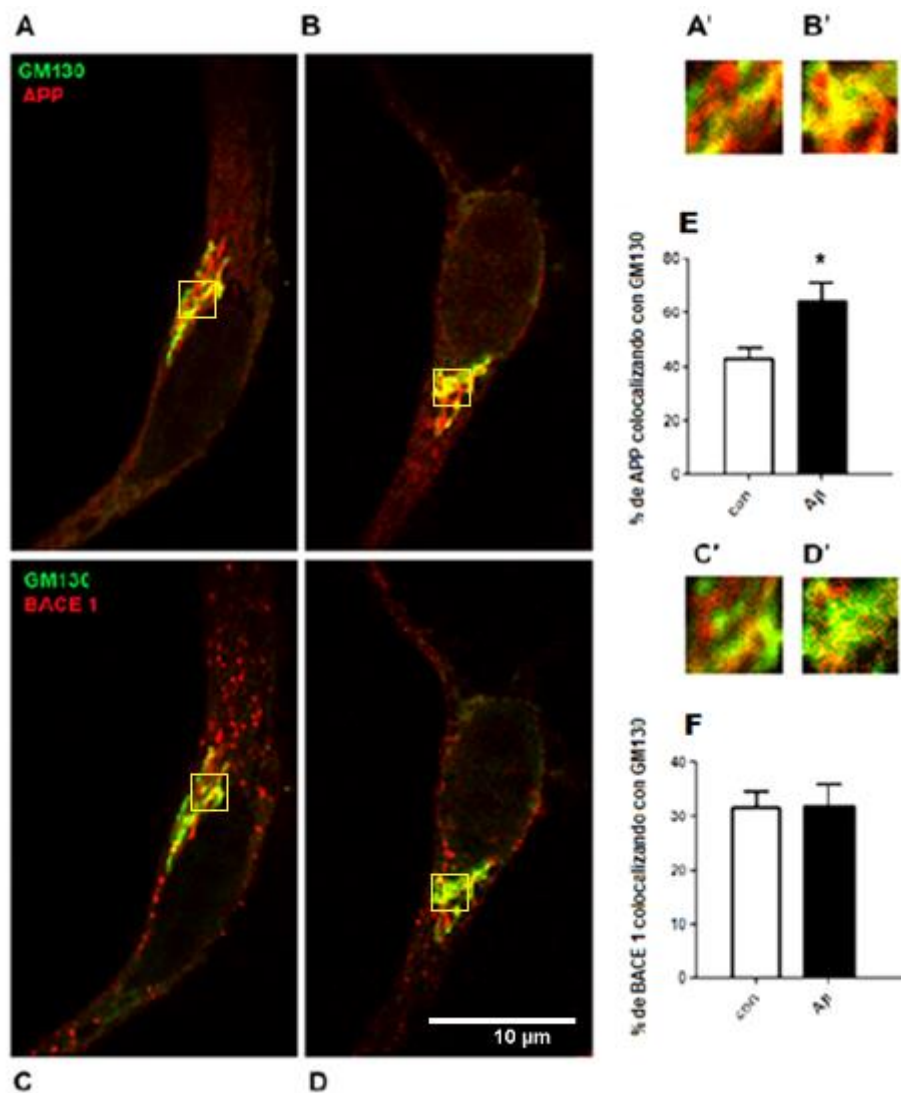


Figura 4.1.4: Efecto del tratamiento con $A\beta$ 10 μ M sobre la expresión de APP-GFP y BACE 1-Cherry en el aparato de Golgi. Cultivos celulares de HELA fueron transfectados con APP-GFP y BACE 1-Cherry y

luego inmunotefidos con anticuerpo anti-GM130 (marcador de aparato de Golgi). Imagen de pseudocolor donde se observa el grado de colocalización de APP con GM130 en condición basal (A) y bajo tratamiento con A β (B). Además, se observa el grado de colocalización de BACE 1 con GM130 en condición basal (C) y bajo tratamiento con A β (D). A', B', C' y D' corresponden a detalles de las imágenes respectivas. E y F) Cuantificación del grado de colocalización de las proteínas analizadas a través de la obtención de los coeficientes de Manders. (n=11) * $p \leq 0,05$.

4.2 Determinación del rol de la interacción A β /APP sobre el tráfico y distribución intracelular de APP y BACE 1

A los fines de evaluar si el cambio observado en la distribución de APP y BACE 1, como consecuencia del tratamiento con A β , depende de la interacción entre este último y el APP de membrana, se utilizó una forma delecionada de APP llamada APP $\Delta\beta$. Esta variante de APP carece del dominio yuxtamembrana del sitio A β que determina la unión de A β a APP (Kedikian y col., 2010).

Se utilizó una forma de APP $\Delta\beta$ fusionada a GFP y se coexpresó con BACE 1-Cherry, de manera análoga a lo que se hizo en experimentos anteriores con APP wt. Los cultivos fueron tratados por 24 hs con vehículo o A β 10 μ M, luego fueron fijados y sometidos al protocolo de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra Rab11 y GM130, tal como se describió anteriormente.

En la figura 4.2.1 (A y B), pudimos observar que el patrón de expresión basal del APP $\Delta\beta$ es ligeramente diferente a la del APPwt, presentando una expresión menos reticular y más vesicular. Sin embargo, el análisis cuantitativo de su colocalización con Golgi y endosoma de reciclaje no se modifica con respecto al APPwt (datos no mostrados), poniendo en evidencia que la ubicación de APP $\Delta\beta$ corresponde a un compartimento que no ha sido marcado en el presente trabajo (posiblemente sea endosoma temprano por su característica morfológica).

Los resultados estadísticos indican que bajo condición basal, APP $\Delta\beta$ y BACE 1 colocalizan en un $65,2 \pm 3,8$ %, mientras que el tratamiento con A β no modificó la distribución de estas dos proteínas ($66,9 \pm 4,1$ %) (ANOVA F(1,17)=0,0899 $p=0,7681$) (Figura C). El análisis del grado de distribución de estas proteínas en los distintos compartimentos subcelulares indica que APP $\Delta\beta$ colocaliza con GM130 en un $41,4 \pm 1,6$ % en los cultivos tratados con vehículo mientras que en cultivos tratados con A β ese porcentaje no cambia respecto al control ($38,1 \pm 1,5$ %) (ANOVA F (1,21)=2,2380 $p=0,14953$) (Figura D). De manera similar, el grado de colocalización entre BACE 1 y GM130 fue de $27,4 \pm 2,8$ % en condición basal; este grado de convergencia no se vio afectado por el tratamiento con A β , siendo de $23,2 \pm 2,7$ % (ANOVA F (1,21)=1,1979 $p=0,28614$) (Figura E).

En cuanto a la expresión de estas proteínas en los endosomas de reciclaje, el porcentaje de colocalización de APP $\Delta\beta$ con Rab11 en condición basal es de $32,8 \pm 3,6$ % y no se modifica con el tratamiento con A β ($36,0 \pm 4,0$ %) (ANOVA F(1,9) 0,3443; $p=0,5717$) (Figura F). El grado de convergencia entre BACE 1 y Rab11 bajo tratamiento con vehículo fue de $25,3 \pm 4,8$ %, el cual no se modificó con el tratamiento con A β , siendo de $25,8 \pm 5,3$ % (ANOVA F(1,9)= 0,0043 $p=0,9493$) (Figura G).

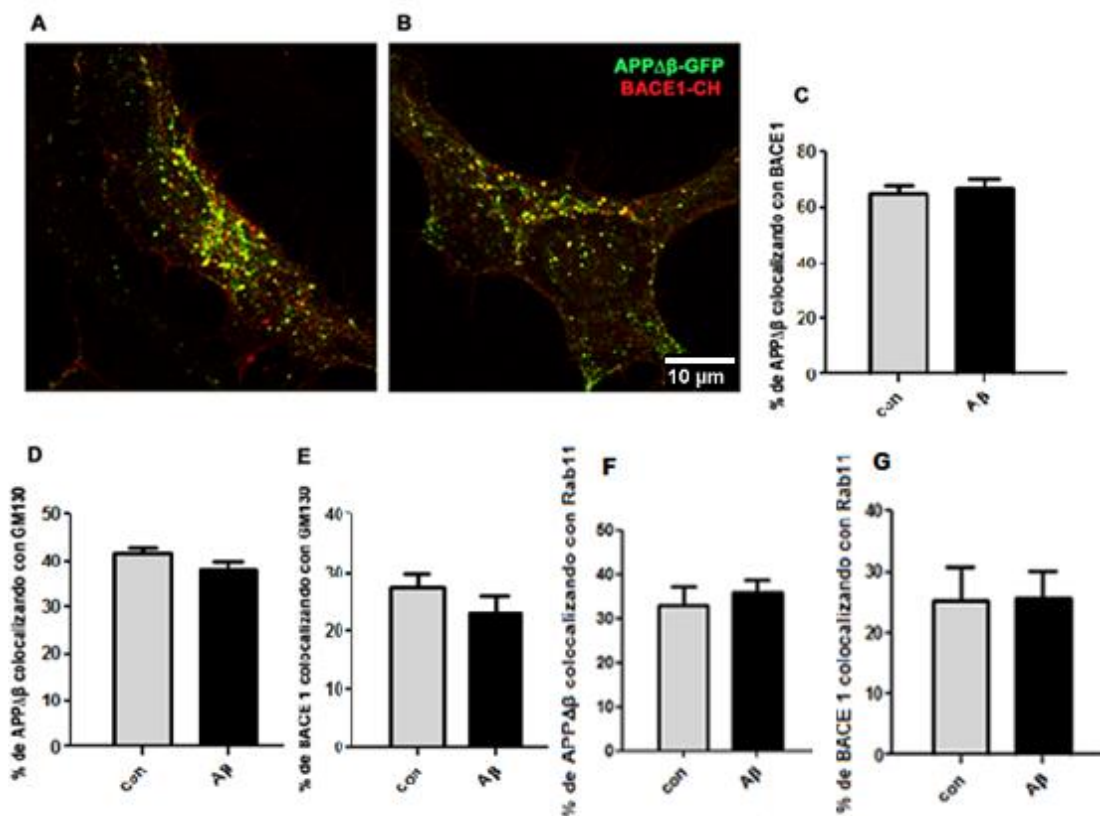


Figura 4.2.1: Efecto del tratamiento con Aβ 10 μM sobre la expresión y distribución subcelular de APPΔβ-GFP y BACE 1-Cherry. Cultivos de células HELA fueron transfectados con APPΔβ-GFP y BACE 1-Cherry e inmunoteñidos con anticuerpos contra Rab11 (marcador de endosomas de reciclaje) o GM130 (marcador de aparato de Golgi). Imagen de pseudocolor donde se observa el grado de colocalización de APPΔβ y BACE 1 en A) condiciones basales y B) bajo tratamiento con Aβ. C) Cuantificación de la colocalización de APPΔβ con BACE 1 en condiciones control y con Aβ, utilizando coeficientes de Manders. D y E) Cuantificación de la colocalización de APPΔβ y BACE 1, bajo tratamiento con vehículo o Aβ, con GM130 a través de coeficientes de Manders, respectivamente. F y G) Cuantificación de la colocalización de APPΔβ y BACE 1, bajo tratamiento con vehículo o Aβ, con Rab11 a través de coeficientes de Manders, respectivamente (n=12).

4.3 Determinación de la participación de la vía APP/Go en la distribución de APP y BACE

Para analizar la participación de la vía APP/Go activada por Aβ, se sembraron 300.000 células HELA en placas de 35 mm. Al día siguiente, los cultivos fueron transfectados con APP-GFP y BACE 1-Cherry. Transcurridos 30 minutos de la transfección, dos placas fueron pretratadas con galeina 5 μM (inhibidor farmacológico del complejo βγ de la proteína G) y otras dos placas fueron tratadas con vehículo. Luego de 30 minutos del tratamiento, una placa pretratada con galeina y otra con vehículo fueron tratadas con Aβ 10 μM y las dos placas restantes fueron tratadas con vehículo. Al día siguiente, los cultivos fueron fijados con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos y montados y fotografiados con una magnificación de 60X en un microscopio confocal. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Fiji para obtener datos de colocalización cuantitativa.

En la figura 4.3.1 A, se puede observar la distribución basal de APP y BACE 1, que colocalizan en un $24,7 \pm 7,0 \%$, la cual no es modificada bajo el tratamiento con galeina, siendo de $17,3 \pm 6,6 \%$ (Figura 4.3.1 C). El tratamiento con $10 \mu\text{M}$ de $\text{A}\beta$ (Figura 4.3.1 B) induce un incremento en la convergencia de ambas proteínas, de $46,6 \pm 6,6 \%$, condición que es prevenida con el pretratamiento con $5 \mu\text{M}$ de galeina, donde la colocalización de ambas proteínas no es diferente de la condición control, con $16,5 \pm 6,6 \%$ de convergencia (Figura 4.3.1 D) (ANAVA $F(3,26)=4,4791$ $p=0,0115$).

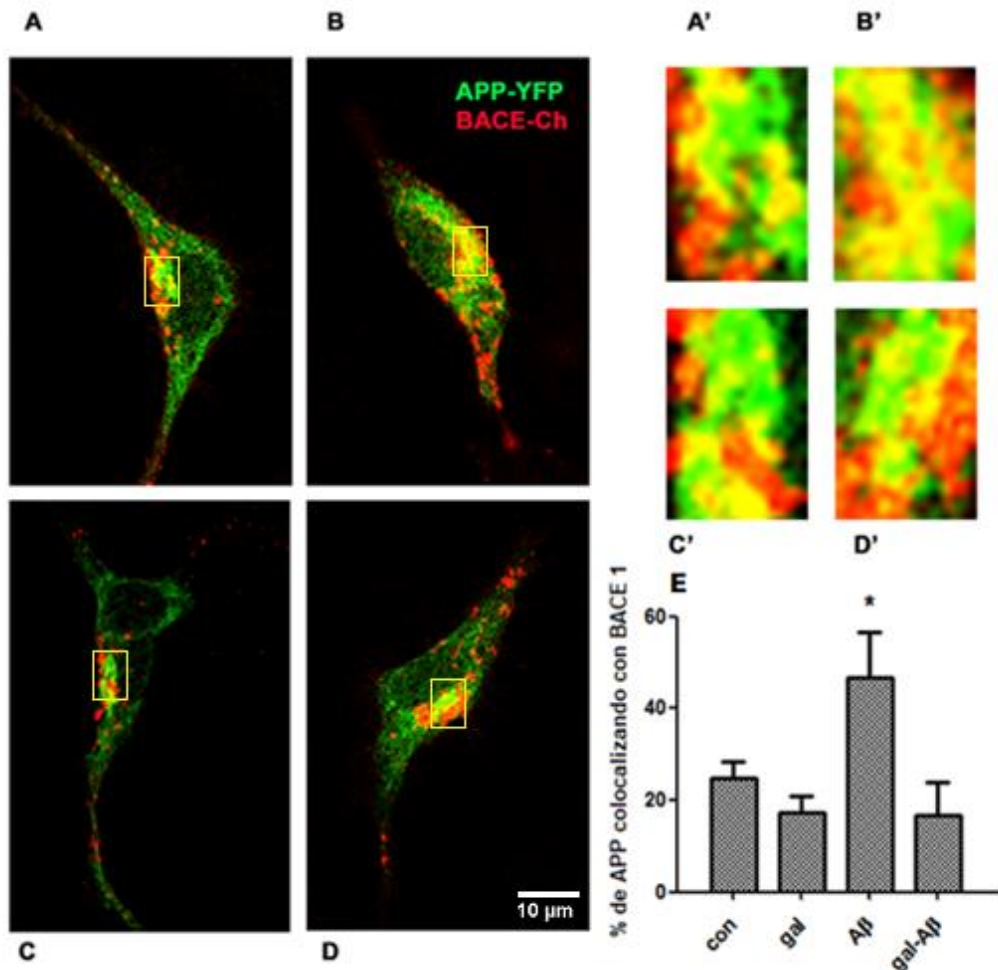


Figura 4.3.1: Efecto del pretratamiento con galeina $5 \mu\text{M}$ sobre el aumento de la convergencia de APP y BACE 1 inducido por $\text{A}\beta$. Cultivos celulares de N2A fueron transfectados con APP-GFP y BACE 1-Cherry. A) Imagen de pseudocolor donde se observa la colocalización de APP y BACE 1 en condiciones control, B) bajo el tratamiento con $\text{A}\beta$, C) bajo el tratamiento con galeina y D) bajo el pretratamiento con galeina al tratamiento con $\text{A}\beta$. A' B' C' y D') Corresponden al detalle de las imágenes A, B, C y D, respectivamente. E) Cuantificación de la colocalización de APP y BACE, en cada condición, a través de la obtención de coeficientes de Manders. (n=12) * $p \leq 0,05$ (test post hoc LSD).

5. Discusión

Conocer el mecanismo por el cual se modula la producción de A β es fundamental para desarrollar intervenciones para evitar el desarrollo de la EA. Particularmente, sería de gran valor dilucidar el mecanismo por el cual el A β puede modular la distribución y convergencia de las proteínas implicadas en la amiloidogénesis, y las moléculas y vías involucradas a fin de detener o revertir este efecto.

Tenemos evidencia no publicada de que el A β induce un aumento en la colocalización de APP y BACE 1, sin embargo, el sitio preciso donde esto ocurre se desconoce. Por lo tanto, además de confirmar el aumento en la colocalización de APP y BACE 1 inducido por A β , nos interesó identificar el compartimento celular en el cual ocurre. En este estudio, utilizando cultivos de células HELA pudimos demostrar que la colocalización tanto de APP como de BACE 1 con endosomas de reciclaje incrementa significativamente realizando un tratamiento con A β . En cuanto a lo que ocurre en el aparato de Golgi, con el tratamiento con A β sólo observamos un aumento significativo en la colocalización de APP con este compartimento, no sucediendo lo mismo con BACE 1. Este resultado podría indicar que el A β exógeno provoca un aumento en el procesamiento de APP por BACE 1 en los endosomas de reciclaje, ya que ambas proteínas aumentan allí su expresión en manera simultánea. Esto resulta razonable ya que una substancial proporción de BACE 1 se encuentra en los endosomas de reciclaje (Chia y col., 2013) que además, este compartimento presenta el pH ácido, óptimo para su actividad enzimática (Vassar, 2014). Sin embargo, no podemos descartar que el aumento de APP en Golgi no sea suficiente para aumentar su procesamiento por BACE1, ya que al aumentar la concentración de sustrato podría incrementar la velocidad de la reacción enzimática. Esta hipótesis deberá ser comprobada en experimentos posteriores.

Estudios realizados en cultivos de neuronas hipocampales estarían en consonancia con este resultado, donde hallaron que APP y BACE1 aumentan su colocalización en endosomas de reciclaje bajo estimulación sináptica con glicina (Das y col., 2013). Nuestros resultados parecen indicar que el A β altera la condición fisiológica normal, en la cual APP y BACE 1 son clasificados en vesículas separadas luego de su síntesis, para limitar su proximidad y por lo tanto, la producción de A β (Das y col., 2013). El A β , tal como lo hace la activación sináptica, modula el tráfico de esas proteínas para conducir las a un sitio preciso en la célula donde ocurre el corte por BACE 1, sugiriendo un aumento en la producción de A β . En consecuencia, se estaría produciendo un efecto amplificador en donde pequeñas cantidades de A β son suficientes para desregular la relación producción/eliminación, lo que conllevaría a su acumulación.

En condiciones fisiológicas, APP y BACE-1 pueden seguir diferentes vías de clasificación, como ser recuperados al TGN, reciclados de la MP por endosomas o conducidos hacia los lisosomas para su degradación. El tiempo de residencia anormal de APP y BACE1 en los endosomas puede llevar a una mayor escisión de APP, y este podría ser el mecanismo patológico de la EA esporádica (Sun y Roy, 2018). Debido a esto, sería de gran importancia dilucidar reguladores de las vías de clasificación de ambas proteínas de modo que sus rutas no estén destinadas al mismo compartimento subcelular y así evitar el procesamiento de APP. Nuestros resultados muestran que el A β genera un aumento en la convergencia entre APP y BACE 1, lo cual puede ser debido a un mecanismo que implique desviar la ruta normal de eliminación de APP, ya que,

luego de la endocitosis, gran parte del APP vesicular es dirigido a los lisosomas y se digiere luego de la fusión endosoma/lisosoma (Marsden y col., 2011), por lo cual, la interrupción de este transporte implicaría una producción aumentada de A β . Esta especulación deberá ser posteriormente verificada.

Por otra parte, se sabe que el péptido A β se une a su secuencia homóloga en el APP (Shaked y col., 2006; Kedikian y col., 2010). Cuando transfectamos los cultivos con el mutante APP $\Delta\beta$, el cual carece del dominio de interacción entre A β y APP, observamos que el patrón de expresión basal del APP $\Delta\beta$ es cualitativamente diferente a la del APPwt, presentando una expresión menos reticular y más vesicular. Esto estaría apoyando el hallazgo obtenido por Dotti y colaboradores, que mostraron que la secuencia A β extracelular del APP es importante en la correcta distribución de la proteína en neuronas hipocampales (Tienari y col. 1996). Sin embargo, tanto estos autores como Kedikian y colaboradores (2010), demostraron por distintas técnicas que esta mutante mantiene su habilidad para llegar a la membrana plasmática lo cual es fundamental para evaluar su rol como receptor de membrana. Por otro lado, del análisis cuantitativo de colocalización corroboramos que la presencia de APP $\Delta\beta$ con Golgi y endosoma de reciclaje no se modifica con respecto al APPwt (datos no mostrados). De manera tal, que el nuevo destino de la proteína corresponde a un compartimento que no ha sido caracterizado en el presente trabajo pero que posiblemente sea endosoma temprano por su característica morfológica. Este aspecto deberá ser corroborado en un análisis posterior.

Encontramos que luego de un tratamiento con A β los niveles de colocalización de APP con BACE 1 se mantuvieron sin cambios, presentando valores similares al control, tanto en endosomas de reciclaje como en el aparato de Golgi. Estos resultados sugieren que se requiere de la interacción de A β con APP para que el cambio en la distribución de APP y BACE 1 inducido por A β ocurra. Es interesante notar, que la presencia de la forma deletada de APP no afecta la distribución basal de BACE 1, pero evita su redistribución en presencia de A β .

Sin embargo, la alterada distribución basal de APP $\Delta\beta$ descrito en párrafos anteriores determina que no se pueda descartar que la ausencia de respuesta frente a la presencia de A β extracelular observada no pueda deberse a un defecto en el tráfico de la proteína, además de su incapacidad de unir A β .

Se sabe que el APP actúa como un receptor para el A β activando una cascada de señalización, luego de la unión de éste, que incluye a la proteína heterotrimérica Go, particularmente a la subunidad $\beta\gamma$ de ésta. Esta cascada de señalización es responsable de varios efectos neurotóxicos del A β , tales como la distrofia neurítica, la hiperfosforilación de tau y la muerte neuronal; los cuales son revertidos utilizando un inhibidor farmacológico de la subunidad $\beta\gamma$, galeina (Bignante y col., 2018). Utilizando cultivos de HELA, evaluamos si galeina también podía evitar el cambio de distribución de APP y BACE 1 inducido por A β , y pudimos determinar que la vía APP/Go/ $\beta\gamma$ tiene participación en la redistribución y aumento de convergencia de APP y BACE 1 inducida por A β . Este hallazgo refuerza el resultado mencionado anteriormente que define a la interacción A β /APP a modo de ligando/receptor como un evento crítico requerido para el cambio en la distribución de APP y BACE1 inducido por A β . A partir de estos hallazgos se pueden plantear estudios posteriores en donde se evalúe si p38-MAPK, cascada debajo de la vía APP/Go/ $\beta\gamma$ (Bignante y col., 2018), está implicada en el cambio en el tráfico

de APP y BACE1, al fosforilar a ellos mismos o a alguno de sus adaptadores. Es importante destacar que la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Go posee diversas funciones, por lo que su bloqueo también podría conducir a efectos adversos. No existen suficientes estudios in vivo para determinar la toxicidad de la droga, sin embargo, Bignante y colaboradores (2018) realizaron un experimento in vivo donde ratones 3xTg-AD, que se usan como modelos de EA, fueron infundidos intrahipocampalmente con galeina, la cual mejoró su estado cognitivo. Por otro lado, no existe evidencia hasta el momento de que galeina interfiera en algún aspecto relacionado a la amiloidogénesis.

En conjunto, los resultados obtenidos hasta aquí sugieren que el A β exógeno induce un cambio en la distribución de APP y BACE 1 que conduce a un aumento de la colocalización de ambas proteínas en endosomas de reciclaje, determinado por la cascada de señalización activada por la unión del A β a su receptor, el APP, en su secuencia homóloga yuxtamembrana, activando la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Go.

Los resultados obtenidos a partir de este proyecto explicarían el mecanismo por el cual una deposición inicial de A β agregado conduciría a la generación de PS y a la progresión de la EA: el A β al interactuar con el APP, alteraría su tráfico conduciéndolo hacia compartimentos subcelulares en donde colocalizaría con BACE 1, induciendo la producción de más A β . Tal secreción aumentada de A β , a su vez, incrementaría la susceptibilidad del A β extracelular a agregarse, y este fenómeno ocurriría sucesivamente en una forma de retroalimentación positiva. Estos hallazgos podrían colaborar en la generación de terapias racionales tendientes a evitar la amiloidogénesis y con ello la aparición y/o progresión de la EA.

6. Bibliografía

- Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., y Van Hoesen, G. W. (1991). The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. *Cerebral Cortex*, 1. (103-116).
- Bignante, E. A., Heredia, F., Morfini, G., y Lorenzo, A. (2013). Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β -induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 34. (2525-2537)
- Bignante, E. A., Ponce, N. E., Heredia, F., Musso, J., Krawczyk, M. C., Millán, J., Pigino, G. F., Inestrosa, N. C., Boccia, M. M., y Lorenzo, A. (2018). APP/Go protein G β γ -complex signaling mediates A β degeneration and cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neurobiology of aging*, 64. (44-57).
- Braak, H., y Braak, E. (1990). Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in cases of presenile and senile dementia. *Acta Neuropathologica*, 80. (479-486).
- Braak, H., y Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82. (239-259).
- Braak, H., Braak, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1986). Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's Disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neuroscience Letters*, 65. (351-355).
- Chia, P. Z. C., Toh, W. H., Sharples, R., Gasnereau, I., Hill, A. F., y Gleeson, P. A. (2013). Intracellular itinerary of internalised β -secretase, BACE1, and its potential impact on β -amyloid peptide biogenesis. *Traffic*, 14(9), (997-1013).
- Choy, R. W., Cheng, Z., y Schekman, R. (2012). Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β (A β) production in the trans-Golgi network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(30). (2077-2082).
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., y Zhong, K. (2018). Alzheimer's disease drugs development pipeline: 2018. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* (195-214).
- Das, U., Scott, D. A., Ganguly, A., Koo, E. H., Tang, Y., y Roy, S. (2013). Activity-Induced Convergence of APP and BACE-1 in Acidic Microdomains via an Endocytosis-Dependent Pathway. *Neuron*, 79. (447-460).
- Das, U., Wang, L., Ganguly, A., Saikia, J. M., Wagner, S. L., Koo, E. H., y Roy, S. (2016). Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway. *Nature Neuroscience*, 19. (55-64).

- Davis-Salinas, J., Saporito-Irwin, S. M., Cotman, C. W., y Van Nostrand, E. W. (1995). Amyloid β -Protein Induces Its Own Production in Cultured Degenerating Cerebrovascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Neurochemistry*, 65. (31-34).
- Greenfield, J. P., Gouras, G. K., y Xu, H. (1998). Cellular and molecular basis of β -amyloid precursor protein metabolism. *Frontiers in Bioscience*, 3. (399-407).
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., y Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* doi: 10.1101/cshperspect.a006270.
- Hardy, J., y Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297. (353-356).
- Harris, J. A., Devidze, N., Verret, L., Ho, K., Halabisky, B., Thwin, M. T., ... y Palop, J. J. (2010). Transsynaptic progression of amyloid- β -induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron*, 68(3). (428-441).
- Heredia, L., Lin, R., Solá Vigo, F., Kedikian, G., Busciglio, J., Lorenzo, A. (2004). Deposition of amyloid fibrils promotes cell-surface accumulation of amyloid β precursor protein. *Neurobiology of Disease*, 16. (617-629).
- Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., y Doms, R. W. (2000). Maturation and Endosomal Targeting of β -Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(43). (33729-33737).
- Kedikian, G., Heredia, F., Rozes Salvador, V., Raimunda, D., Isoardi, N., Heredia, L., y Lorenzo, A. (2010). Secreted Amyloid Precursor Protein and Holo-APP Bind Amyloid β Through Distinct Domains Eliciting Different Toxic Responses on Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 88. (1795-1803).
- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., y Hyman, B. T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *Journal of Cell Science*, 116(16). (3339-3346).
- Lammich, S., Kojro, M., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., y Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96. (3922-3927).
- Marsden, I. T., Minamide, L. S., y Bamburg, J. R. (2011). Amyloid- β -induced amyloid- β secretion: a possible feed-forward mechanism in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(4). (681-691).
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*, 362. (75-79).
- O'Brien, R., y Wong, P. (2011). Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual review of neuroscience*, 34. (185-204).

- Pastorino, L., Ikin, A. F., Nairn, A. C., Pursnani, A., y Buxbaum, J. D. (2002). The Carboxyl-Terminus of BACE contains a Sorting Signal That Regulates BACE Trafficking but Not the Formation of Total A β . *Molecular and Cellular Neuroscience*, 19. (175-185).
- Prabhu, Y., Burgos, P. V., Schindler, C., Farías, G. G., Magadán, J. G., y Bonifacino, J. S. (2012). Adaptor protein 2-mediated endocytosis of the β -secretase BACE1 is dispensable for amyloid precursor protein processing. *Molecular Biology of the Cell*, 23. (2339-2351).
- Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., Veerle, B., Coen, K., Munkc, S., De Strooper, B., Schiavo, G., Annaert, W. (2011). ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34). (559-568).
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*, 81(2). (741-766).
- Selkoe, D. J., y Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6). (595-608).
- Shaked, G. M., Kummer, M. P., Lu, D. C., Galvan, V., Bredesen, D. E., y Koo E. H. (2006). A β induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597–624). *The FASEB Journal*, 20. (1254-1256).
- Sola Vigo, F., Kedikian, G., Heredia, L., Heredia, F., Díaz Añel, A., Rosa, A. L., y Lorenzo, A. (2009). Amyloid- β precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid β through Go protein activation. *Neurobiology of Aging*, 30. (1379-1392).
- Sun, J., y Roy, S. (2018). The physical approximation of APP and BACE-1 - a key event in Alzheimer's disease pathogenesis. *Developmental Neurobiology*, 78(3). (340-347).
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., y Citron, M. (1999). β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science*, 286. (735-741).
- Vassar, R. (2014). BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's research & therapy*, 6(9). (89-103).
- Tienari, P. J., De Strooper, B., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Czech, C., Hartmann, T., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L., Van Leuven, F. Beyreuther, K., y Dotti, C. G. (1996). The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *The EMBO Journal*, 15(19), (5218-5229).
- Toh, W. H., Chia, P. Z. C., Hossain, M. I., y Gleeson, P. A. (2017). GGA1 regulates signal-dependent sorting of BACE1 to recycling endosomes which moderates A β production. *Molecular biology of the cell*, 29(2). (191-208).

Yan, R., y Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3). (319-329).