

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

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL PÉPTIDO BETA
AMILOIDE SOBRE EL TRÁFICO INTRACELULAR DE APP
Y BACE 1

Tesinista: Freites, Leandro

Firma:.....

Director: Bignante, Anahí

Firma:.....

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

INIMEC – CONICET – UNC

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE SOBRE EL
TRÁFICO INTRACELULAR DE APP Y BACE 1**

Tribunal examinador:

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

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

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

Calificación:.....

Fecha:.....

Abreviaturas

A β : Amiloide beta

APP: Proteína Precursora de Amiloide (Amyloid Precursor Protein)

BACE 1: β -secretasa (Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1)

CTFs: Fragmentos C-terminal (C-Terminals Fragments)

DAPT: (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-Alanyl]-S-Phenylglycine T-butyl ester)

D-MEN: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sulfóxido (DiMethyl SulfOxide)

EA: Enfermedad de Alzheimer

HS: Suero de caballo (Horse Serum)

ON: Ovillos neurofibrilares

PBS: Buffer fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)

PEI: Polietilenimina (PolyEthyleneImine)

PS: Placas seniles

SDS: Dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate)

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

YFP: Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein)

Índice

Contenido

1. Resumen.....	4
2. Introducción	6
3. Materiales y Métodos	14
3.1 Cultivos celulares	14
3.2 Plásmidos	14
3.3 Anticuerpos.....	14
3.4 Transfección.....	14
3.5 Tratamientos.....	15
3.6 Inmunocitoquímica	15
3.7 Análisis de Colocalización	16
3.8 Western blot	16
3.9 Análisis estadístico.....	16
4. Resultados	17
4.1 Caracterización de la expresión de BACE 1 y BACE 1-Cherry en líneas celulares..	17
4.2 Efecto del tratamiento con A β en la distribución de APP y BACE 1 en cultivos celulares	20
4.3 Determinación del sitio de convergencia APP/BACE 1	21
4.4 Efecto del tratamiento con A β sobre los niveles de CTFs en cultivos celulares....	24
5. Discusión	25
6. Conclusión	27
7. Bibliografía	28

1. Resumen

Pocos diagnósticos en la medicina moderna resultan más desalentadores que el de enfermedad de Alzheimer (EA). Esta patología se caracteriza, a nivel histopatológico, por la presencia de placas extracelulares de amiloide β ($A\beta$) y acúmulos intracelulares de la proteína tau anormalmente fosforilada conocidos como ovillos neurofibrilares. La relación entre el $A\beta$ y la EA se sustenta en una larga serie de evidencias genéticas, patológicas, clínicas y moleculares. Sin embargo, el mecanismo fisiopatológico por el cual $A\beta$ contribuye al desarrollo de la EA es aún materia de debate. El $A\beta$ se genera a partir de la proteína precursora del $A\beta$ (APP). Esta proteína es clivada por la proteasa BACE 1 y posteriormente por una γ -secretasa, siendo el primer clivaje el paso crítico del procesamiento de APP.

Numerosos reportes proponen que tanto APP como BACE 1 son inicialmente dirigidas a la membrana plasmática y luego son internalizadas hacia el sistema endosomal en donde interactuarían iniciando el procesamiento amiloidogénico de APP. Sin embargo, también existen reportes que muestran que el corte amiloidogénico de APP se daría en vesículas derivadas del aparato Golgi con lo cual se desprende que el sitio subcelular de amiloidogénesis no está ciertamente determinado. Adicionalmente, también se desconoce cuál es el estímulo fisiológico/patológico que lleva a que APP y BACE 1 converjan iniciando la vía amiloidogénica. Basados en cierta evidencia bioquímica que muestra que el $A\beta$ es capaz de inducir su propia secreción a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, nos propusimos dilucidar si este fenómeno implica un cambio en la distribución subcelular de APP y/o BACE1. En el presente trabajo de tesina de grado utilizaremos líneas celulares para expresar tales proteínas fusionadas a un reportero fluorescente con el fin de caracterizar su distribución subcelular y evaluar si su ubicación y convergencia, es modulada por la presencia del $A\beta$. Los datos obtenidos en este sistema experimental, nos permitirán plantear las bases metodológicas para realizar este estudio en un sistema más adecuado, pero mucho más complejo como lo es el cultivo hipocampal primario.

Encontramos que en cultivos de líneas celulares tratados con $A\beta$, aumenta la convergencia de APP y BACE 1, y la producción de CTFs (fragmentos c-terminales) con respecto a los cultivos control. Además, los resultados obtenidos hasta aquí nos permiten especular que la convergencia basal de tales proteínas ocurre tanto en endosomas de reciclaje como en vesículas derivadas de Golgi. Sin embargo, el tratamiento con $A\beta$ induciría un incremento en el encuentro entre APP y BACE 1, selectivamente en vesículas derivadas de Golgi.

Esclarecer aspectos relacionados a la amiloidogénesis, y como esta puede ser modulada por cambios en la distribución de las proteínas implicadas en tal proceso (APP y BACE 1), sería de gran relevancia para entender el fenómeno de deposición de $A\beta$ y por ende la progresión de la EA.

PALABRAS CLAVES: $A\beta$, APP, BACE 1, amiloidogénesis, TGN, endosoma de reciclaje.

2. Abstract

The physiopathological mechanism by which amyloid beta ($A\beta$) contributes to the development of Alzheimer disease (AD) is still under discussion. $A\beta$ is a metabolic product of amyloid- β precursor protein (APP). When APP is cleaved by β -secretase (also called BACE 1) and γ -secretase, $A\beta$ is released. Several reports suggest that APP and BACE-1 are internalized from the cell membrane, however, the cell compartment where this two protein interact remains elusive. Furthermore, the physiological or pathological stimulus that triggers APP and BACE 1 convergence is unknown. In this work, we found that treatment with $A\beta$ increases the percentage of convergence of APP and BACE-1 and the concomitant production of CTFs in cell lines. Besides, these two proteins would interact in Golgi-derived vesicles with $A\beta$ stimulus. Elucidate the APP-BACE 1 subcellular distribution and modulation will be relevant to clarify how $A\beta$ is aggregated and deposited in order to understand the emergence and progression of AD.

3. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) está considerada como la principal causa de demencia y es la cuarta causa de muerte en países desarrollados. Esta patología es la quinta afección que más amenaza a los argentinos, después de las enfermedades infecciosas, el cáncer, la diabetes y las deficiencias en la alimentación.

Se define como un padecimiento neurodegenerativo que se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cerebrales superiores. Si bien numerosos centros de investigación alrededor del mundo se dedican a investigar el origen y mecanismos involucrados en esta patología, la causa de la EA aún no ha sido clarificada.

Los primeros síntomas que se manifiestan en la EA son casi imperceptibles y se evidencian como pérdida de memoria a corto plazo. Generalmente el paciente mantiene su autonomía y pocas veces requiere ayuda adicional. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes desarrollan afecciones como desorientación espacio-temporal e imposibilidad de realizar tareas cotidianas. En este punto, la gran mayoría requiere de un cuidador para desenvolverse diariamente. En estadios avanzados, los enfermos experimentan pérdida total de memoria, alteraciones del estado de ánimo y cambios conductuales, problemas del lenguaje y trastornos cognitivos. Finalmente, durante la etapa terminal, se observa demencia y atrofia muscular, condenando a la persona a permanecer en reposo e incapacitada de alimentarse por sí misma (Yaari and Corey-Bloom, 2007).

Numerosos estudios realizados postmortem y en vivo mediante resonancia magnética nuclear han demostrado que, a nivel macroscópico, los cerebros de las personas con EA poseen dilataciones de los ventrículos cerebrales laterales, disminución del volumen cerebral y atrofia en estructuras como el hipocampo, el lóbulo temporal medial y zonas de la neocorteza (Braak and Braak, 1991; Scahill et al, 2002).

En 1907, el Dr. Alois Alzheimer describió las dos estructuras histopatológicas características de esta enfermedad: los ovillos neurofibrilares (ON) y las placas seniles (PS). La primera lesión, el ovillo neurofibrilar, está formada de filamentos helicoidales intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada (Kidd, 1963; Brion et al., 1985). La segunda lesión, llamada placa senil o neurítica, consiste en un depósito extracelular del péptido amiloide beta ($A\beta$). (Figuras 1 y 2).

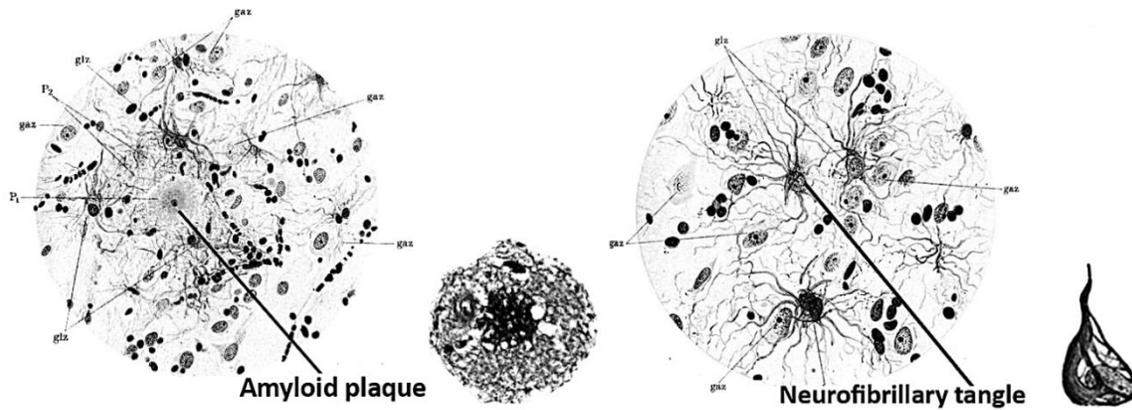


Figura 1: Dibujos del Dr. Alois Alzheimer mostrando los cambios patológicos que observó en el cerebro de uno de sus pacientes. En la ilustración izquierda se muestran una placa senil y en la derecha se visualiza un ovillo neurofibrilar.

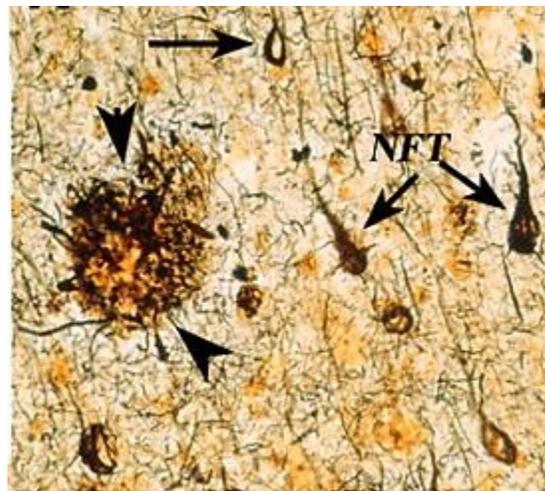


Figura 2: Histopatología de la EA. Microfotografía que muestra una sección de un cerebro afectado por EA teñido con la técnica de Bielschowsky. Se muestra una placa senil (puntas de flecha) y ovillos neurofibrilares (flechas).

Existe un patrón de distribución temporal de las lesiones histopatológicas características en la EA. Durante los primeros estadios de la enfermedad, los ON están confinados a una pequeña zona de la región trans-entorrinal (zona de transición localizada entre la región entorrinal y la neocorteza temporal adyacente). Posteriormente, numerosas estructuras límbicas como el hipocampo, la amígdala y el tálamo se ven también afectadas. Finalmente, los ON se esparcen por todas las áreas de la neocorteza. Con respecto a las PS, en etapas iniciales, éstas se encuentran en las porciones basales de la neocorteza. Con la progresión de la enfermedad, las placas neuríticas se extienden a todas las áreas de

asociación de la neocorteza (en este punto el hipocampo se encuentra medianamente afectado). En estadios avanzados, las PS se encuentran en prácticamente todo el neocórtex del paciente, hipocampo, cerebelo y áreas subcorticales (Arnold et al., 1991; Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002).

En 1984, el péptido A β fue identificado como el péptido constituyente de las PS (Glennner y Wong, 1984). Posteriormente se descubrió que el A β comprendía un segmento minoritario de una proteína de mayor tamaño (Kang et al., 1987), la cual fue nombrada como Proteína Precursora de Amiloide Beta (APP, del inglés *Amyloid Precursor Protein*). APP es una proteína transmembrana de tipo I, constituida por un extenso dominio extracelular, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular. La secuencia del A β comprende los 28 aminoácidos de su dominio extracelular yuxtamembrana y, entre 12 o 14 residuos de su dominio transmembrana (Figura 3).

El péptido A β es generado por un procesamiento proteolítico a partir de APP, y dicho proceso ocurre durante el metabolismo celular normal (Haass et al., 1992). Se han identificado dos vías proteolíticas principales para APP: la ruta o vía amiloidogénica, la cual conlleva a la producción de A β ; y la ruta no amiloidogénica, donde el péptido amiloide no es generado. En la primera vía mencionada, la proteína APP es clivada secuencialmente por dos enzimas, una β - y una γ -secretasa (Haass, 2004; Vassar et al., 1999). La actividad de la enzima β -secretasa o BACE 1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) sobre el dominio extracelular genera un fragmento soluble denominado sAPP β y un fragmento que permanece anclado a la membrana denominado C99 o β APP CTF (CTF, C-terminal fragments). El fragmento C99 es posteriormente escindido por la γ -secretasa, dando origen al A β , el cual es liberado al medio extracelular, y a un pequeño péptido intracelular llamado AICD (Figura 3). Se sabe que sólo una fracción minoritaria de APP es procesada por la ruta amiloidogénica, y que la mayoría del pool de esta proteína es procesada a través de la ruta no amiloidogénica. En esta última, APP es clivada en la zona intermedia de la región que comprende al A β por una α -secretasa. Como producto de la actividad de esta enzima se forma un fragmento soluble denominado sAPP α y un fragmento llamado C83 o α APP CTF. Éste último es sustrato de la γ -secretasa, generando el péptido p3 y el fragmento AICD (Figura 3).

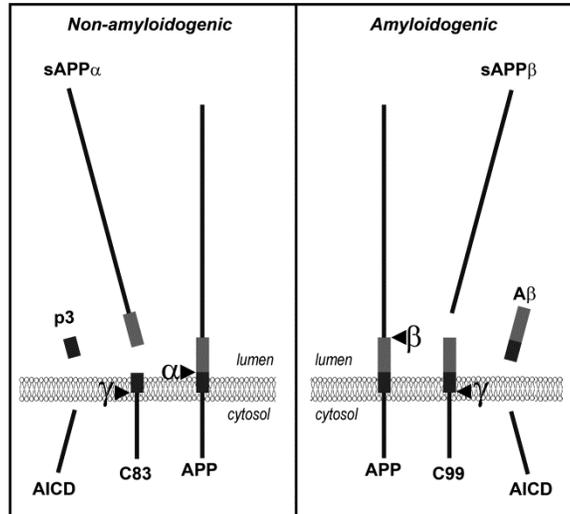


Figura 3: Procesamiento proteolítico de APP. APP es una proteína transmembrana metabolizada por dos rutas alternativas: la vía no amiloidogénica (izquierda) y la vía amiloidogénica (derecha). Aβ es generado luego del clivaje secuencial de APP por una β- y una γ-secretasa (Adaptado de Bignante et al., 2013).

Es ampliamente aceptado por la comunidad científica el hecho de que el péptido Aβ y sus distintas formas agregadas serían los desencadenantes de los procesos patológicos de la EA (Selkoe, 1999), en lo que ha sido llamado "Hipótesis de la cascada del Aβ" (Hardy y Selkoe, 2002). Esta hipótesis propone que numerosos factores genéticos (mutaciones en APP, trisomía del cromosoma 21, etc.) y/o ambientales alterarían el normal metabolismo de APP, favoreciendo la agregación y deposición de Aβ. Esto, a su vez, favorecería la formación de los ON, y en última medida finalmente, la disfunción y muerte neuronal (Figura 4).

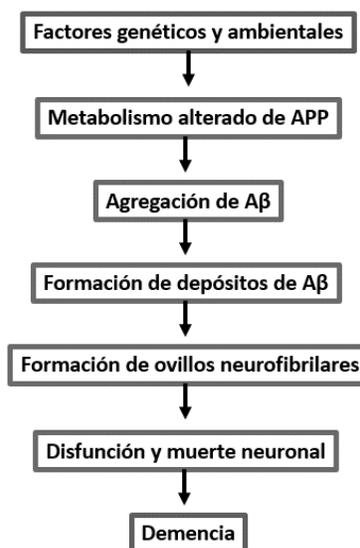


Figura 4: Hipótesis de la cascada del amiloide. Secuencia simplificada de los eventos patológicos de la EA.

Si bien la hipótesis de la cascada del A β recibe aceptación de gran parte de la comunidad científica, los mecanismos por el cual el péptido A β desencadena y sustenta el proceso neurodegenerativo continúan siendo motivo de debate.

Numerosos estudios utilizando modelos celulares y animales ponen en evidencia la importancia del clivaje de APP por BACE1, como paso inicial en la síntesis del A β , en la etiología de la enfermedad.

En la década de los 90 se generó un modelo murino llamado Tg2576, que sobreexpresa APP humano con una doble mutación, característica de la forma sueca de la EA. Los ratones mutantes presentaban un incremento de 5 veces en la secreción de A β , y a la edad de 9-11 meses desarrollaban placas seniles en áreas cerebrales típicamente afectadas por la EA (Hsiao, 1996). En el año 2001, por otra parte, se generó un ratón knock-out para BACE 1 y se observó que estos ratones carecían de depósitos de A β , incluso cuando eran cruzados con ratones Tg2576 que sobreexpresaban APP (Luo et al., 2001). Más aún, la sobreexpresión de BACE 1 en ratones que sobreexpresan APP con la doble mutación sueca acelera la producción y deposición de A β (Mohajeri et al., 2004).

BACE 1 es una aspartil proteasa transmembrana de tipo I (Hong et al., 2000; Yan et al., 1999) sintetizada y modificada post/co-transcripcionalmente mediante N-glicosilación, formación de puentes disulfuro y palmitoilación en el retículo endoplásmico (Benjannet et al., 2001; Capell, A. et al., 2000), y procesada por furina y otras proteasas en el aparato de Golgi (Capell, A. et al., 2000; Creemers et al., 2001). BACE 1 puede ser re-internalizada desde la membrana plasmática en endosomas tempranos, enviada al trans-Golgi para su reciclaje (Walter et al., 2001), y luego exportada nuevamente a la superficie celular. Este proceso depende de un motivo dileucina localizado en el dominio citoplasmático de la enzima (Huse et al., 2000; Pastorino et al., 2002).

Investigaciones sobre la bioquímica y modulación de BACE 1 serían vitales para comprender la dinámica, ubicación a nivel subcelular y otros aspectos relevantes del clivaje de APP en la vía amiloidogénica. El procesamiento no amiloidogénico de APP por α -secretasa ocurriría en la membrana plasmática (De stropper et al., 1993), sin embargo, el compartimento celular donde ocurre el procesamiento de APP por β -secretasa es aún materia de investigación y debate. Algunos reportes han localizado la generación de A β en el sistema endosomal (Koo y Squazzo, 1994), en la red del trans-Golgi (Haass et al., 1995; Thinakaran et al., 1996; Xu et al., 1997) y en el retículo endoplásmico (Chyung et al., 1997; Cook et al., 1997). Actualmente, la "hipótesis endosomal" está cobrando relevancia gracias a fuertes evidencias que la sustentan. Como una aspartil-proteasa, BACE 1 posee un óptimo de actividad a pH ácidos (alrededor de 4,5) (Vassar et al., 1999), el cual es consistente con el encontrado dentro de los endosomas. Aún más, factores que promueven la internalización de APP o BACE 1 (Grbovic et al., 2003; Zou et al., 2007) aceleran la producción de A β , mientras que, bloqueando su internalización, se disminuyen los niveles de A β (Carey et al., 2005; Chyung y Selkoe, 2003).

Reportes recientes en distintas líneas celulares demuestran que, luego de su biosíntesis, tanto APP como BACE 1, son reciclados de la membrana plasmática y convergen en endosomas tempranos, donde interaccionan iniciando el procesamiento amiloidogénico en el estado basal (Kinoshita et al., 2004; Sannerud et al., 2011) (Figura 5). Sannerud y colaboradores expusieron que, a diferencia de APP que es internalizada por un mecanismo dependiente de clatrina; la internalización de BACE 1 en endosomas utiliza una ruta que está regulada por el factor 6 de ribosilación-ADP (ARF6) y es independiente de clatrina. Por otro lado, Choy y colaboradores definen que para la producción de A β se requeriría de un transporte adicional desde endosoma hasta la red del trans-Golgi mediado por el retrómero (Choy et al., 2012). Adicionalmente, Das y colaboradores demostraron que los endosomas de reciclaje, distribuidos en espinas dendríticas y botones presinápticos de neuronas hipocampales, son el principal sitio de convergencia de APP y BACE 1, pero que en los axones, el punto de encuentro se daría en vesículas derivadas de Golgi. (Das et al., 2015).

En consecuencia, el sitio de encuentro entre estas dos proteínas, y de inicio de la vía amiloidogénica es aún materia de debate.

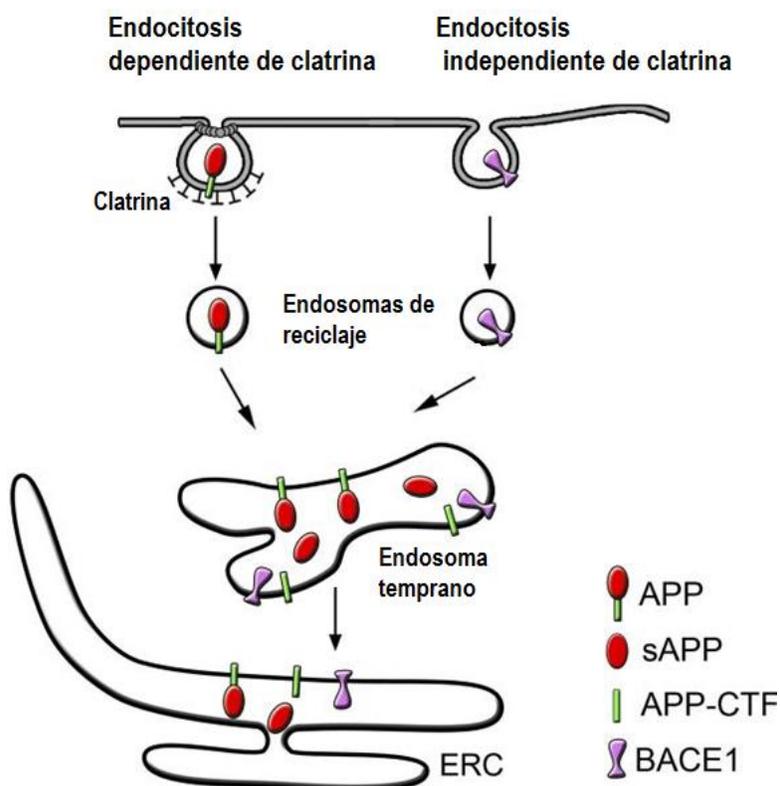


Figura 5: Transporte diferencial de BACE-1 y APP desde la membrana plasmática hacia los endosomas tempranos (Adaptado de Sannerud et al. 2011).

Aún se desconoce cuál es el estímulo fisiológico y/o patológico que desencadena el incremento en la convergencia de APP y BACE 1, favoreciendo así la vía amiloidogénica. Davis-Salinas y colaboradores afirman que A β ₁₋₄₂ podría inducir severas respuestas patológicas en cultivos celulares, incluyendo degeneración celular con un marcado incremento en la producción del péptido amiloide β (Davis-Salinas, J. et al, 1995).

En un trabajo posterior se demuestra que el efecto pro-amiloidogénico del A β se observa también en cultivos neuronales (Marsden et al., 2011). Estas evidencias vislumbran un fenómeno en el que A β actuaría como un estímulo para su propia secreción, lo cual tendría una gran relevancia para entender el fenómeno de la deposición de A β en el contexto de la EA.

Hallazgos de nuestro y otros laboratorios muestran que APP podría actuar como el receptor de los agregados de A β modulando efectos tóxicos de A β (Bignante et al., 2013). Dichos agregados generarían una multimerización aberrante de APP, distrofia neuronal y neurodegeneración (Heredia et al., 2004; Shaked et al., 2006; Solá Vigo et al., 2009; Bignante et al., En preparación). Ligado a los efectos tóxicos dependientes de la interacción A β /APP, 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.

Particularmente, planteamos el objetivo de estudiar mecanísticamente como el tratamiento con A β es capaz de inducir su propia secreción, indagando su rol sobre el tráfico intracelular de APP y BACE 1.

Esta tesina corresponde al punto de partida de tal proyecto general, la cual desde un modelo simple, utilizando líneas celulares; busca desarrollar las herramientas metodológicas necesarias para continuar luego esta investigación en modelos más complejos como los cultivos hipocampales primarios.

Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar por microscopía de alta resolución la re-distribución intracelular de APP y BACE 1 frente al tratamiento con A β .

Se utilizarán células HELA co-transfectadas con APP-YFP y BACE 1-Cherry, y posteriormente tratadas con vehículo o A β , a fin de determinar la distribución intracelular de las dos proteínas mencionadas.

2. Identificar los posibles sitios de interacción de APP y BACE 1.

Se emplearán células HELA transfectadas con cDNA de APP y BACE 1 e inmunoteñidas con marcadores de sistema endosomal o Golgi para vislumbrar el sitio de amiloidogénesis basal y luego del tratamiento con A β .

3. Evaluar el efecto de A β sobre la expresión de CTFs en cultivos celulares, como medida indirecta de la amiloidogénesis inducida por A β .

Se analizará por medio de la técnica de Western blot el efecto del tratamiento con formas tóxicas de A β sobre los niveles de producción de CTFs en cultivos de células HEK que sobreexpresan APP y BACE 1.

4. Materiales y Métodos

4.1 Cultivos celulares

Se emplearon las líneas celulares HELA y HEK293. Las primeras son células de origen epitelial derivadas de cáncer cérvico-uterino, mientras que las segundas provienen de riñón humano embrionario. El uso de ambas está ampliamente extendido en el campo de la biología celular. Las células fueron sembradas en placas de 35 mm y mantenidas en medio D-MEN (Gibco, N. Y., U.S.A.) suplementado al 10% con suero fetal bovino (Gibco, N. Y., U.S.A.) y los antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco, N. Y., U.S.A.). Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 37 °C en una atmósfera saturada de humedad y con 5% de CO₂. Cabe recalcar que para análisis de expresión de proteínas por Western blot se emplearon cultivos sembrados sobre plástico, mientras que las células sembradas sobre vidrios se utilizaron para las inmunomarcaciones y microscopía.

4.2 Plásmidos

Los plásmidos utilizados fueron: pEYFP-N3 (Clontech, California, U.S.A.) que contiene la secuencia que codifica la proteína amarilla fluorescente (YFP), APPwt-YFP (constructo generado en el laboratorio de Neuropatología Experimental, INIMEC) conteniendo la forma salvaje de APP fusionada a la proteína amarilla fluorescente y BACE 1-Cherry (constructo cedido gentilmente por el Dr. Roy) que contiene la β -secretasa fusionada a una proteína fluorescente roja. Adicionalmente, se emplearon plásmidos de las proteínas APP y BACE 1 sin fusionar (plásmido obtenido en el laboratorio de Neuropatología Experimental y cedido gentilmente por el Dr. Annaert, respectivamente).

4.3 Anticuerpos

Para los ensayos de inmunocitoquímica se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: el anticuerpo monoclonal anti-Rab11 (1:50; Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.), que reconoce proteínas miembros de la familia Rab11 (isoformas Rab11a y Rab11b), ubicadas en endosomas de reciclaje; y el anticuerpo primario policlonal anti-GM130 (1:500, Sigma Aldrich, San Luis, U.S.A), marcador de Golgi. Para los ensayos de bioquímica se utilizó el anticuerpo monoclonal Y188 (1:500; Abcam, San Francisco, U.S.A.) que reconoce la porción intracitoplasmática del APP.

4.4 Transfección

Los cultivos celulares se desarrollaron en placas de 35 mm hasta alcanzar un 80 % de confluencia. Fueron co-transfectados con la siguiente mezcla: DNA de interés (APP-YFP y BACE 1-Cherry), 125 μ L de NaCl 0,15 M y 3 μ L de PEI87K (Fabricado y vendido por el Dr.

Martinez, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). 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 %.

4.5 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, U.S.A.). Una cantidad de 100 μ g del fragmento A β ₂₅₋₃₅ fue diluido 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. Dicha preparación fue posteriormente incorporada a los cultivos 1 hora luego de la transfección para alcanzar una concentración final de 20 μ M.

Para el análisis de los fragmentos CTFs se utilizó DAPT para inhibir la γ -secretasa (Sigma Aldrich, San Luis, U.S.A.), diluido en DMSO a una concentración inicial de 100 mM. La droga se agregó 16 horas luego de la transfección y una hora antes de incorporar el A β a una concentración final de 10 μ M. El tiempo de duración de los tratamientos se detalla en cada experimento.

4.6 Inmunocitoquímica

Los cultivos celulares fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS/sucrosa a 37 °C durante 20 minutos. Una vez fijados, se realizaron tres lavados con PBS 1X. Para la permeabilización, los cultivos fueron tratados con Tritón X-100 0,2 % en PBS durante cinco minutos. Luego, se efectuaron dos nuevos lavados con PBS 1X. Posteriormente, los cultivos fueron bloqueados con suero de caballo (HS) al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las células fueron luego incubadas con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en HS al 1% en PBS durante toda la noche a 4 °C. Después, los cultivos fueron sometidos a cinco lavados de cinco minutos con PBS, para luego ser incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa Flour, Molecular Probes, Eugene, U.S.A) disuelto en HS al 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación, las células fueron lavadas cinco veces con PBS, y finalmente montadas sobre portaobjetos empleando el medio de montaje FluorSave (Sigma Aldrich, San Luis, U.S.A.). Los preparados fueron observados en un microscopio confocal FV1000 Olympus con un objetivo de 63X de magnificación.

4.7 Análisis de Colocalización

Las imágenes fueron procesadas y analizadas mediante el software Fiji. El grado de colocalización de APP-YFP con BACE 1-Cherry fue determinado empleando el plugin Coloc 2, a través del cual se pudieron obtener los coeficientes de Manders los cuales permiten definir los porcentajes de colocalización entre una y otra marca.

4.8 Western blot

Los cultivos celulares fueron lavados con PBS frío y cosechados a 4 °C en buffer RIPA-DOC (0,44 g NaCl; 2,5 mL Tris-HCl 1M pH=7,2; 0,5 mL Tritón X-100; 0,5 mL SDS 10%; 0,25 g dodecilsulfato de sodio cada 50 mL de H₂O) con inhibidores de proteasas (Tabletas Sigma Fast TM). Las mezclas fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes (conteniendo las proteínas solubles) fueron recuperados y diluidos en buffer Laemmli 4X. Luego, las muestras fueron incubadas a 98 °C durante cinco minutos.

Volúmenes idénticos de cada muestra fueron sembrados en geles de poliacrilamida-SDS del 15%. Las proteínas en la muestra fueron separadas por electroforesis (120 V durante dos horas) y posteriormente electrotransferidas (250 mA durante noventa minutos) a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, California, U.S.A.). Luego, la membrana fue incubada en solución de leche en polvo descremada al 5% en PBS - Tween 20 al 0,05% durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido dicho periodo, la membrana es incubada con anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de leche en polvo al 1% durante 24 horas a 4°C. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana fue sometida a tres lavados de siete minutos en PBS con Tween 20 al 0,05%, y luego incubada con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:1000; Jackson Immunoresearch, West Grove, U.S.A.) diluido en leche en polvo al 1% en PBS con Tween 20 al 0,05% durante una hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, la membrana se sometió a tres lavados de siete minutos en PBS con Tween 20 al 0,05% y fue visualizada por quimioluminiscencia (ELC, Amersham Life Science, U.K.). Se realizó un análisis de densitometría de las bandas con el software Scion Image.

4.9 Análisis estadístico

Los datos fueron comparados estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de comparaciones post hoc con el test de Tukey.

5. Resultados

5.1 Caracterización de la expresión de BACE 1 y BACE 1-Cherry en líneas celulares

La primera parte de la tesina se basó en la obtención y caracterización de los plásmidos utilizados en los distintos experimentos. Se trabajó con los plásmidos BACE 1 y BACE 1-Cherry, mientras que APP-YFP fue generado y caracterizado previamente por integrantes del laboratorio. Las distintas alícuotas de ADN plasmídicos fueron amplificadas utilizando técnicas básicas de biología molecular. La purificación fue realizada mediante la técnica de Mini-prep y utilizando el kit comercial Qiagen plasmid midi kit.

Para una verificación y caracterización inicial de la expresión de las proteínas BACE 1 y BACE 1-Cherry, se transfectaron líneas celulares HEK293 con cantidades crecientes de DNA a fin de obtener una curva de concentración creciente. Las proteínas fueron identificadas inequívocamente por un anticuerpo específico contra BACE 1 (Abcam; ab2077 policlonal, 1:1000). Brevemente, se plantaron aproximadamente 600.000 células HEK en placas Petri de 35 mm de diámetro. Al día siguiente, el cultivo fue transfectado con el reactivo PEI, con 0,125, 0,25 ó 0,5 µg de DNA BACE 1. Al otro día, los cultivos fueron lisados en buffer RIPA con inhibidores de proteasas, resuspendidos en buffer Laemmli y resueltos en un sistema SDS-PAGE. Se utilizaron geles de acrilamida al 8 % y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % (1 hora a temperatura ambiente) e incubadas con el anticuerpo primario contra BACE 1 de Abcam (Anti-BACE1 antibody, ab2077 polyclonal, 1:1000) a 4º C durante la noche entera en agitación. Finalmente, se hicieron tres lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit HRP (1:5000). Las membranas fueron reveladas con el buffer ECL (Western Bright, USA).

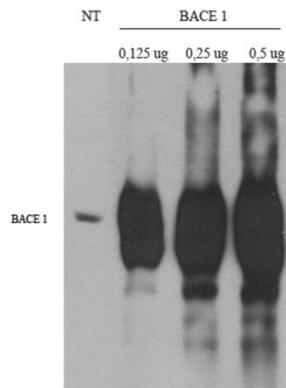


Fig. 1.1: Caracterización de la expresión de BACE1 por Western Blot. Cultivos celulares de HEK fueron transfectados con concentraciones crecientes de BACE 1 y los lisados celulares resueltos por SDS-PAGE.

Como puede observarse en la Figura 1.1, en el cultivo no transfectado (NT) se observa una banda que corresponde al BACE 1 endógeno de las células. En las tres líneas siguientes se observa la proteína en cantidades crecientes conforme aumenta la cantidad de DNA que se utilizó en la transfección.

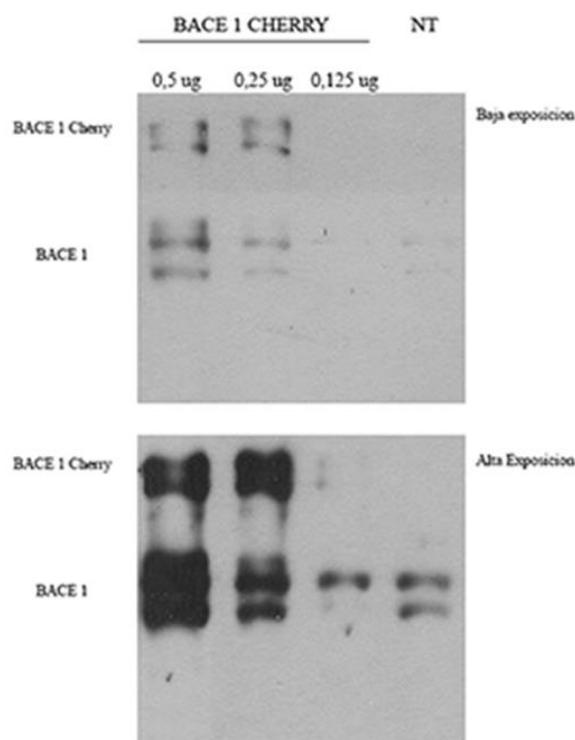


Fig. 1.2. Caracterización de la expresión de BACE 1-Cherry por Western Blot. Cultivos celulares de HEK fueron transfectados con concentraciones decrecientes de BACE 1-Cherry y los lisados celulares resueltos por SDS-PAGE.

En la Figura 1.2 se visualiza la sobreexpresión de la proteína BACE 1-Cherry. En el carril que tiene el lisado de células no transfectadas (NT) se observa un doblete que corresponde al BACE 1 endógeno (más visible en el blot de mayor exposición). Los carriles consecutivos a la izquierda presentan el BACE 1 de los lisados celulares transfectados con concentraciones decrecientes de ADN. Se observa un doblete superior que corresponde al BACE 1 fusionado a al reportero Cherry. Estos blots demuestran que los plásmidos en cuestión se están expresando correctamente.

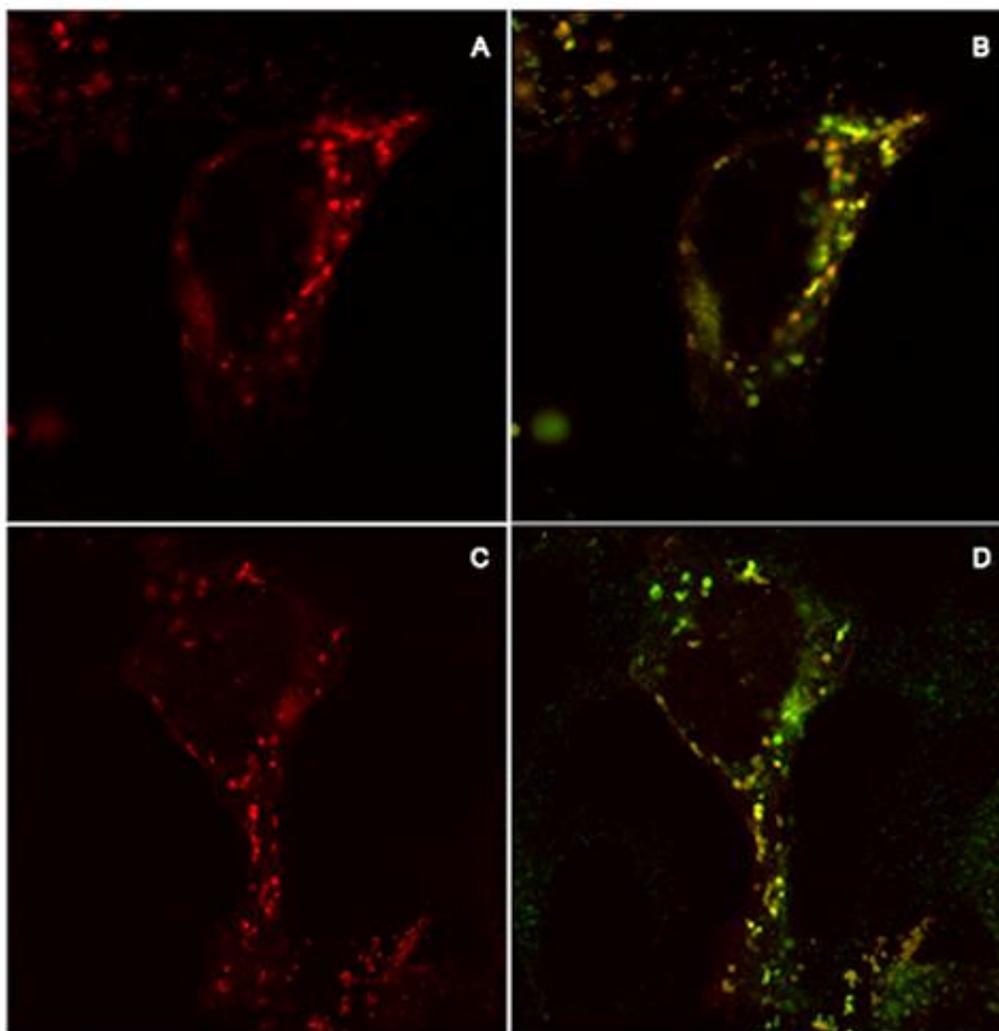


Fig. 1.3. Caracterización de la expresión de BACE 1-Cherry por microscopia. Cultivos celulares de HELA fueron transfectados con BACE 1-Cherry y luego teñidos con marcadores de **A-B)** Golgi (GM130) **C-D)** endosoma de reciclaje (Rab11), en verde.

Para llevar a cabo la caracterización de la expresión de la proteína fusionada por microscopia, comparamos dos líneas celulares: HEK 293 y HELA. Encontramos que las células HELA, al ser planas permiten una mejor visualización de las vesículas conteniendo a BACE 1-Cherry. En la figura 1.3 se observa la caracterización de BACE 1-Cherry en cultivos celulares de HELA. Se puede ver que la marca es claramente vesicular, expresándose tanto en aparato de Golgi como en endosomas de reciclaje.

5.2 Efecto del tratamiento con A β en la distribución de APP y BACE 1 en cultivos celulares

Para evaluar 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 (300.000 células en placas de 35 mm de diámetro), seguida de una co-transfección con APP-YFP y BACE 1-Cherry con el reactivo PEI. Se evaluaron dos concentraciones diferentes de cada ADN plasmídico:

APP-YFP (0,125 μ g) y BACE 1-Cherry (0,2 μ g), y APP-YFP (0,25 μ g) y BACE 1-Cherry (0,40 μ g). Los mejores resultados se visualizaron con este último par de concentraciones. Luego, a las 24 horas se realizó un tratamiento con vehículo o A β 20 μ M. Adicionalmente, se testearon tres tiempos diferentes de tratamiento: 24 horas, 72 horas y 96 horas. Se determinó que a las 24 y 72 horas se observaron diferencias cualitativas en la colocalización de APP y BACE con respecto al control, por lo que estos periodos fueron seleccionados para continuar los experimentos. Finalmente, los cultivos fueron fijados, montados y fotografiados con una magnificación de 62X en un microscopio confocal de fluorescencia (FV1000, Olympus). Las imágenes obtenidas fueron sometidas a un análisis de colocalización con el plugin Coloc 2 del software Fiji y se obtuvieron los correspondientes coeficientes de Manders.

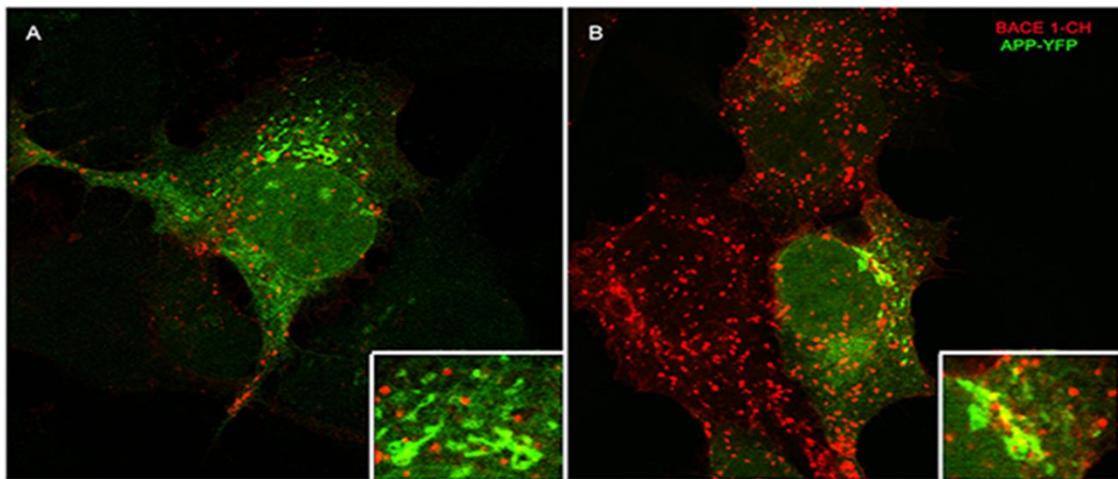


Fig. 2.1: Efecto del tratamiento A β 20 μ M sobre la distribución subcelular de APP-YFP y BACE 1-Cherry. Cultivos celulares de HELA fueron transfectados con APP-YFP y BACE 1-Cherry y analizados por microscopía confocal de fluorescencia. **A)** En el cultivo control se puede observar la expresión basal de APP con una distribución ubicua en distintas estructuras membranosas mientras que la expresión de BACE 1 es claramente vesicular. **B)** El tratamiento con A β 20 μ M indujo un aumento en el grado de colocalización entre ambas proteínas el cual es más evidente en el detalle ubicado en el recuadro inferior.

Como puede observarse en la Figura 2.1, en condiciones controles APP-YFP y BACE 1-Cherry presentan un bajo nivel de colocalización, mientras que el porcentaje de colocalización se incrementa significativamente con el tratamiento con A β .

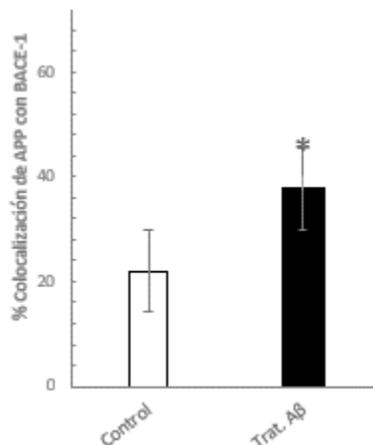


Fig. 2.2: Cuantificación del porcentaje de colocalización.

El análisis estadístico de los datos indicó que el $22,0 \pm 0,1\%$ del APP-YFP colocaliza con BACE 1-Cherry en condiciones controles, y aumenta al $37,6 \pm 0,1\%$ en condiciones de tratamiento (ANOVA de una vía ($F_{1,20}$)=7,2475; $p=0,01402$). $n = 15$ células analizadas por cada condición, obtenidas de tres experimentos independientes. (* $p < 0.05$ test post hoc Tukey HSD) (Figura 2.2).

5.3 Determinación del sitio de convergencia APP/BACE 1

Como ya se ha mencionado, el compartimiento intracelular preciso donde APP y BACE 1 interaccionan continúa siendo objeto de debate. En este trabajo, intentamos determinar su identidad mediante ensayos de colocalización utilizando marcadores de organelas que se han propuesto como posibles sitios de amiloidogénesis (ver Introducción). Cultivos de células HELA fueron co-transfectados con $0,25 \mu\text{g}$ y $0,40 \mu\text{g}$ de APP-YFP y BACE 1-Cherry respectivamente. Veinticuatro horas después, las células fueron tratadas con vehículo o A β $20 \mu\text{M}$ y fijadas 72 horas después. Posteriormente, siguiendo el protocolo de inmunocitoquímica, los cultivos fueron incubados con el anticuerpo monoclonal anti-Rab11 (1:50), marcador de endosoma de reciclaje; y el anticuerpo primario policlonal anti-GM130 (1:500, Sigma), marcador de Golgi (Figura 3.1).

C

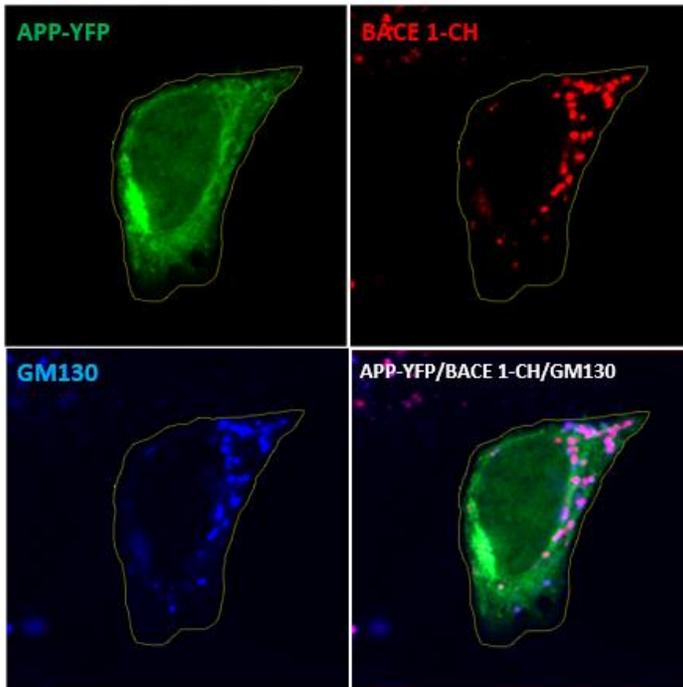
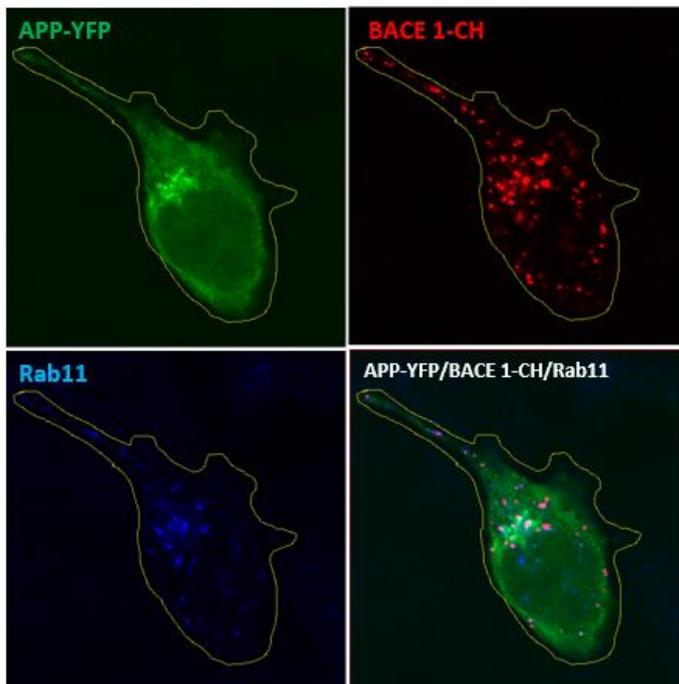


Fig. 3.1: Distribución de APP-YFP y BACE 1-Cherry en distintos compartimientos subcelulares.

Cultivos celulares fueron co-transfectados con APP-YFP, BACE 1-Cherry, e inmunomarcados contra **C)** Golgi (GM130), **D)** endosomas de reciclaje (Rab11). La última imagen de cada panel muestra la colocalización entre APP-YFP y BACE 1-CH y el correspondiente marcador de zona.

D



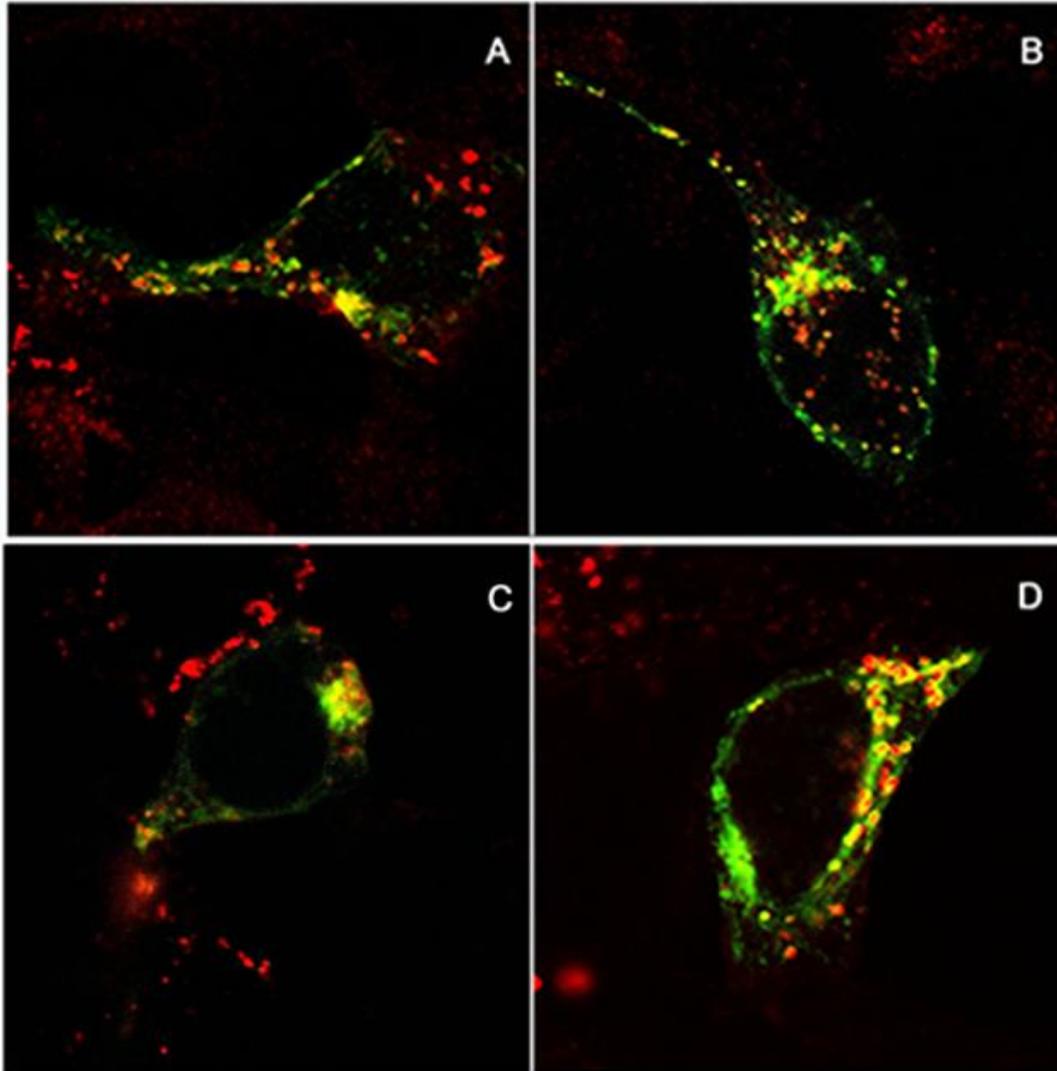


Fig. 3.2: Correlación entre la colocalización APP/BACE y los diferentes compartimentos subcelulares. Células co-transfectadas con APP-YFP/BACE 1-Cherry e inmunomarcadas con el anticuerpo **A) – B)** anti-GM130. **C) – D)** anti- Rab11. La marca verde corresponde a APP-YFP/BACE 1-Cherry y la marca roja corresponde a los marcadores de endosomas de reciclaje **A) – B)** y Golgi **C) – D)**.

Para determinar cualitativamente en que compartimento subcelular ocurriría la localización conjunta de APP y BACE 1, se realizó un mapa de colocalización entre estas dos proteínas, y luego éste fue superpuesto con las imágenes de inmunomarcación de Golgi o endosomas de reciclaje. Como se puede apreciar en la Figura 3.2, existe una correlación entre los sitios de encuentro de APP con BACE 1 (marca verde), y endosomas de reciclaje en la condición basal (Foto A); la cual se mantiene en similar magnitud luego del tratamiento con Aβ (Foto B). En cambio, el solapamiento entre APP/BACE 1 y vesículas derivadas de Golgi en la condición basal es bajo (Foto C), y aumenta con el tratamiento con Aβ (Foto D).

5.4 Efecto del tratamiento con A β sobre los niveles de CTFs en cultivos celulares

A los fines de confirmar por métodos bioquímicos los resultados obtenidos mediante microscopía, se efectuó un análisis de los CTFs mediante la técnica de Western blot. Recordemos que los CTFs son los fragmentos C83 y C99 que quedan luego del corte α y β secretasa respectivamente, sobre el APP (Figura 3, Introducción). De manera tal que, la cuantificación de los niveles de CTFs es una medida indirecta del grado de producción de A β . Un aumento en el encuentro APP/BACE 1 (sustrato/enzima) debería aumentar la cantidad de β CTF y por ende de CTFs total y de A β producido.

Se realizaron una serie de experimentos utilizando lisados celulares de células HEK 293 co-transfectadas con APP y BACE 1. Luego, los cultivos fueron pre-tratados con el inhibidor de γ -secretasa DAPT con el fin de aumentar el tiempo de vida media de los CTFs. Posteriormente los cultivos fueron tratados con vehículo o A β 20 μ M durante 24 horas o 96 horas. Las fracciones proteicas fueron finalmente analizadas mediante Western blot.

Para ello, se utilizó el anticuerpo Y188, el cual reconoce APP c-terminal y los CTFs. Como puede observarse en la figura 4, en cultivos controles el tratamiento con DAPT se incrementaron en gran medida los niveles de CTFs a un grado fácilmente cuantificable (Blot A). Además, se encontró que en el tratamiento con A β de 96 horas, pero no de 24 horas, indujo un aumento del 20 % en los niveles dichos fragmentos. (Blot B).

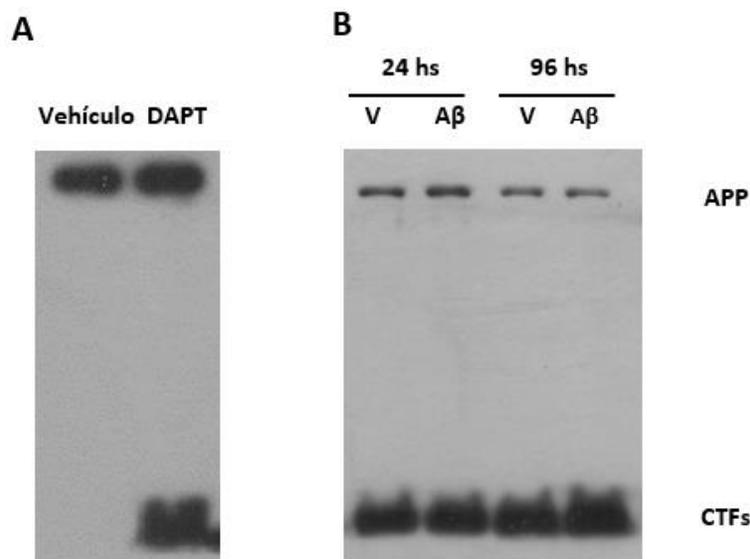


Fig. 4. Efecto del tratamiento con A β sobre la expresión de fragmentos CTFs. Cultivos celulares fueron co-transfectados con APP y BACE 1, y luego tratados con DAPT. La formación de los fragmentos CTFs fue evaluada mediante Western blot. **A)** Caracterización del efecto del inhibidor de γ -secretasa, DAPT, sobre la expresión de CTFs. **B)** Efecto del tratamiento con A β 20 μ M sobre la expresión de fragmentos CTFs a distintos tiempos de tratamientos.

6. Discusión

El presente trabajo aporta algunos datos que permiten comprender como A β induce su propia secreción afectando el tráfico intracelular de APP y BACE 1.

Pudimos comprobar que el tratamiento con A β genera, en cultivos celulares, un cambio en la distribución subcelular de APP y BACE 1 aumentando su convergencia y desencadenando así el procesamiento amiloidogénico de APP. De esta forma, el amiloide β estaría actuando como un estímulo patológico que gatilla su propia síntesis y secreción.

En un estado basal observamos que APP-YFP presenta la típica distribución membranosa puntiforme a lo largo de los distintos compartimentos subcelulares. Se concentra la marca de APP en la zona perinuclear, reminescente del aparato de Golgi, tal como ha sido ampliamente descrito (Haass et al., 2012). En cambio, BACE 1 presenta una distribución vesicular muy definida, que se condensa en ciertas partes de la célula, en general perinuclearmente.

Mediante el análisis de colocalización pudimos corroborar un bajo grado de colocalización entre APP y BACE en el estado basal (cultivos tratados con vehículo, Figura 2.1 A) lo cual está de acuerdo con reportes previos que manifiestan que luego de su biosíntesis APP y BACE divergen a distintos compartimentos subcelulares (Das et al., 2013).

Encontramos que el tratamiento con A β 20 μ M, aumentó la convergencia de APP-YFP y BACE 1-Cherry en un 15 % con respecto al control (Figura 2.1 B). Este resultado nos estaría revelando que efectivamente, los agregados de A β actúan como un estímulo patológico que promueve la convergencia de APP y BACE 1 (sustrato-enzima) sugiriendo un consecuente aumento en la producción de A β .

Este mecanismo de retroalimentación positiva es de gran relevancia para sustentar la idea de que pequeñas cantidades de A β agregado, podrían actuar a modo de semilla estimulando la producción de más péptido. Es posible especular con que esta producción extra de A β , podría conducir a que la concentración extracelular sea lo suficientemente alta como para superar la tasa de degradación y generar las condiciones óptimas para la aparición y diseminación de las placas. Este estudio abre interesantes interrogantes en torno a que, si este fenómeno ocurre en células neuronales, podría explicar el fenómeno de transmisión transináptica de las placas amiloides a lo largo de los circuitos neuronales (Harris et al., 2010).

Como ya se ha mencionado, la localización del procesamiento proteolítico de APP ha sido descrito en distintas organelas, incluyendo el retículo endoplasmático (Chyung et al., 1997; Cook et al., 1997), en la red del trans-Golgi (Haass et al., 1995; Thinakaran et al., 1996; Xu et al., 1997; Choy et al., 2012), y en el sistema endosomal (Koo y Squazzo, 1994; Sannerud et al., 2011; Das et al., 2013). Aquí, nos propusimos revelar si APP y BACE se

encuentran físicamente en mayor medida en respuesta al A β , como parte del mecanismo que provoca el aumento en la secreción de A β inducido por A β . De ser así, nos interesó indagar cuál es el compartimiento subcelular donde tal evento ocurre. Utilizamos cultivos de células HELA co-transfectadas con APP-YFP/BACE1-cherry y posteriormente inmunoteñidos con anticuerpo marcadores de endosomas de reciclaje o de Golgi (Figura 3.2). En nuestro sistema experimental, obtuvimos evidencia en favor de que en un estado basal APP/BACE 1 se encuentran mayoritariamente en endosomas de reciclaje lo cual estaría en consonancia con lo descrito por Das y colaboradores (2013, 2015). Este evento no es afectado por la presencia de A β . Sin embargo, el aumento en la convergencia APP/BACE en el cultivo tratado con A β , ocurre diferencialmente en vesículas derivadas de Golgi (Figura 3.2). La técnica de cuantificación de la colocalización utilizada en este trabajo presenta la limitante de que no es posible agregar una tercer variable a cuantificar por lo que se hizo la superposición de la imágenes (mapa de colocalización de APP-YFP con BACE1-Cherry, más el marcador de Golgi o endosoma de reciclaje) y se realizó un análisis cualitativo. Este dato deberá ser posteriormente corroborado por una técnica alternativa, por ej. Fraccionamiento subcelular y análisis de APP, BACE 1 y los distintos marcadores subcelulares a lo largo de las distintas fracciones.

Existen alguna evidencia que remarca el rol primordial de la endocitosis de APP dependiente de clatrina desde la membrana plasmática para la ocurrencia de la amiloidogénesis (Sannerud et al., 2011, Das et al., 2013). Relacionado a ello y en base a nuestros resultados, podemos proponer que APP es endocitado diferencialmente en condiciones basales o en presencia de A β , reclutándose en distintos compartimentos celulares lo cual podría tener distintas consecuencias, por ejemplo, distinta eficiencia en la producción de A β , aspecto que deberá ser posteriormente evaluado. Asimismo, otra posibilidad es que la diferencia en la localización del encuentro entre APP y BACE, responda a que son afectados distintos pools de APP, y que por tanto, el APP que se encuentra con BACE 1 en vesículas derivadas de Golgi en respuesta al A β , surja de un aumento de la síntesis de APP y consecuente convergencia en la vía biosintética y no en la vía endocítica como se sugiera al iniciar el párrafo.

Adicionalmente, utilizamos una técnica bioquímica para corroborar lo que obtuvimos por medio de la microscopia. En este caso, cultivos de células HEK fueron co-transfectados con APP/ BACE 1, pretratados con el inhibidor de la γ -secretasa DAPT y tratados con vehículo o A β 20 μ M. El pretratamiento con DAPT se usa para evitar el corte de la γ -secretasa y de esa forma aumentar el tiempo de vida media del CTF para su visualización y análisis por Western blot. En este escenario, logramos corroborar que el tratamiento de 96 horas con A β provocó un aumento en la expresión de los CTFs, lo que sugeriría un aumento en la amiloidogénesis (Figura 4).

Entendemos que el aumento en la convergencia de APP y BACE 1 son el paso inicial a la vía amiloidogénica pero esto no deja de ser una medida indirecta, ya que el CTF resultante

podría por alguna razón, no alcanzar el corte de la γ -secretasa y la consecuente producción real de $A\beta$. Por lo cual, el aumento de $A\beta$ como consecuencia del tratamiento con $A\beta$ en nuestro sistema experimental, debería ser corroborado a través de una medición por ELISA del $A\beta$ producido en cada condición, análisis que no ha sido realizado en la presente tesina por cuestiones de tiempo.

Finalmente, se sabe que BACE 1 se expresa principalmente en tejido neuronal y que la deposición de $A\beta$ ocurre solo en el cerebro. Además, el metabolismo, tráfico y procesamiento de APP en las neuronas, presenta aspectos peculiares relativos a su polaridad extrema. Esto pone en evidencia que los datos obtenidos en esta tesina deberán ser explorados en el futuro en cultivos neuronales. El valor agregado de este trabajo radica en que ha permitido poner a punto herramientas metodológicas necesarias para encarar tal análisis.

7. Conclusión

En el presente trabajo observamos que el tratamiento de cultivos de líneas celulares con agregados de $A\beta$, aumentó el grado de convergencia entre APP y BACE 1 y la consecuente producción de CTFs, lo cual podría significar un aumento en la producción y secreción de $A\beta$. Esta convergencia parece ocurrir diferencialmente en vesículas derivadas de Golgi, dato que deberá ser corroborado con técnicas alternativas.

Estos hallazgos arrojan luz de como estaría ocurriendo mecanísticamente el aumento de $A\beta$ inducido por $A\beta$, evento que es de gran relevancia para comprender el fenómeno de deposición en la EA.

8. Bibliografía

- Arnold, S.E. et al.** (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1: 103–116.
- Benjannet, S. et al.** (2001). Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* 276: 10879–10887.
- Bignante, E. A. et al.** (2013). Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β -induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34(11):2525-37.
- Braak H. and Braak E.** (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239–259.
- Brion, J. et al.** (1985). Mise en évidence immunologique de la protéin tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* 95: 299-235.
- Capell, A. et al.** (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem.* 275: 30849–30854.
- Carey, R. M. et al.** (2005). Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *Cell Biol.* 6:30.
- Choy, R. W. et al.** (2012). Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β ($A\beta$) production in the trans-Golgi network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(30):2077-82.
- Chyung, A. S. C., et al.** (1997). Novel β -secretase cleavage of β -amyloid precursor protein in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *J. Cell Biol.* 138:671–680.
- Chyung, J. H. and Selkoe, D.J.** (2003). Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem.* 278(51):51035-43.
- Cook, D. G. et al.** (1997). Alzheimer's $A\beta$ (1–42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.* 3:1021–1023.

Creemers, J. W. et al. (2001). Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem.* 276: 4211–4217.

Das, U. et al. (2015). Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway. *Nat Neurosci.* 19(1):55-64.

Davis-Salinas, J. et al. (1995). Amyloid beta-protein induces its own production in cultured degenerating cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neurochem.* 65(2):931-4.

De Strooper, B. et al. (1993). Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J Cell Biol.* 121(2):295-304.

Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885-890.

Grbovic, O. M. et al. (2003). Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Aβ production. *J Biol Chem.* 278(33):31261-8.

Haass, C. et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* Sep 24; 359(6393):322-5.

Haass, C. et al. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med.* 1(12):1291-6.

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

Haass, C. et al. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2(5):a006270.

Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297, 353.

Harris, J. A. et al. (2010). Transsynaptic progression of amyloid-β-induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron.* 68(3):428-41.

Heredia, L. et al. (2004). Deposition of amyloid fibrils promotes cell-surface accumulation of amyloid beta precursor protein. *Neurobiol Dis.* 16:617–629.

Hong, L. et al. (2000). Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science.* 290(5489):150-3.

- Hsiao, K.** (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 04: 99-103.
- Huse, J.T. et al.** (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem*. 275: 33729–33737.
- Kang et al.** (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325(6106):733-6.
- Kidd, M.** (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197: 192–193.
- Kinoshita, A. et al.** (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J. Cell Sci*. 116,3339–3346.
- Koo, E. H., Squazzo, S. L.** (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem*. 269:17386–17389.
- Luo, Y. et al.** (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nature Neuroscience* 4, 231 – 232.
- Marsden, I. T. et al.** (2011). Amyloid- β -induced amyloid- β secretion: a possible feed-forward mechanism in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 24(4):681-91.
- Mohajeri, M. H. et al.** (2004). Transgenic BACE expression in mouse neurons accelerates amyloid plaque pathology. *J Neural Transm*. 111(3):413-25.
- Pastorino, L. et al.** (2002). The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A (beta). *Mol Cell Neurosci*. 19: 175–185.
- Pearson, H. A. and Peers, C.** (2006). Physiological roles for amyloid beta peptides. *J. Physiol*. 575, 5-10.
- Sannerud, R., et al.** (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 of the United States of America*. 108(34):E559-E568.
- Scahill, R. I. et al.** (2002). Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: Unbiased analysis of fluid-registered serial MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(7):4703-4707.
- Shaked, G. M. et al.** (2006). A β induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624) *FASEB J*. 20:1254–1256.

- Selkoe, D. J.** (1999). Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol.* 10:373-403.
- Solá Vigo, F. et al.** (2009). Amyloid-beta precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid beta through Go protein activation. *Neurobiol Aging.* 30:1379–1392.
- Thal, D. R., et al.** (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 58 (12):1791-800.
- Thinakaran, G. et al.** (1996). Metabolism of the “swedish” amyloid precursor protein variant in Neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the β -secretase site occurs in the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 271:9390–9397.
- Vassar, R., et al.** (1999). β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286, 735-741.
- Walter, J. et al.** (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem.* 276: 14634–14641.
- Xu, H. et al.** (1997). Generation of Alzheimer β -amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:3748–3752.
- Yaari, R. and Corey-Bloom, J.** (2007). Alzheimer's disease. *Semin Neurol.* 27(1):32-41. Review.
- Yan, R. et al.** (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature.* 402(6761):533-7.
- Zou, L. et al.** (2007). Receptor tyrosine kinases positively regulate BACE activity and Amyloid-beta production through enhancing BACE internalization. *Cell Res.* 17(5):389-401.