

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

**PARTICIPACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN APP-G<sub>0</sub> EN LA  
DESREGULACIÓN DE LA DINÁMICA INTRACELULAR  
DE CA<sup>2+</sup> INDUCIDA POR EL AMILOIDE BETA**

**Tesinista:** Lucrecia Barone

Firma: .....

**Director:** Dr. Alfredo Lorenzo

Firma: .....

**Co-Directora:** Dra. Mariana Bollo

Firma: .....

Laboratorio de Neuropatología Experimental

Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra INIMEC-

CONICET-UNC



I N I M E C

Tesina para optar por el título de Biólogo

**Participación de la señalización APP-G<sub>o</sub> en la desregulación de la dinámica intracelular de Ca<sup>2+</sup> inducida por el amiloide beta**

**Alumna:** Lucrecia Barone

Firma: .....

**Director:** Dr. Alfredo Lorenzo

Firma: .....

**Co-Directora:** Dra. Mariana Bollo

Firma: .....

**TRIBUNAL EXAMINADOR**

Dra. Anahí Franchi

Firma: .....

Dra. Laura Montroull

Firma: .....

Dr. Gustavo Pigino

Firma: .....

Calificación: .....

Fecha: .....

## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional de Córdoba por permitirme acceder a educación pública de calidad y poder optar por un título de grado.

A Mariana y Fredi, por guiarme, inculcarme la vocación científica, y darme la oportunidad de aprender junto a ellos.

A Pau y Magui, mis compañeras de laboratorio, que me recibieron con mucha calidez, me enseñaron y ayudaron con todo lo que necesité.

A mis amigos y amigas que me regaló la biología, por acompañarme en la cotidianidad del día a día, darme una mano en todo, y hacer que este camino que transitamos juntos haya sido hermoso.

A mis amigas del pueblo, por estar a mi lado, brindarme su cariño y sacarme una sonrisa cuando fue necesario.

Y a mi familia, por el amor, la motivación y el apoyo incondicional desde siempre.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introducción</b> .....	7
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	9
<b>Materiales y métodos</b>	
Reactivos.....	10
Cultivos celulares.....	11
Plásmidos .....	12
Transfección .....	12
Tratamiento con A $\beta$ .....	13
Fijación .....	13
Anticuerpos .....	13
Inmunocitoquímica .....	13
Western Blot .....	13
Microscopía .....	14
Determinaciones de Ca <sup>2+</sup> .....	14
Análisis de imágenes .....	15
Análisis estadístico .....	15
<b>Resultados</b> .....	16
<b>Discusión</b> .....	25
<b>Referencias</b> .....	29

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la patología neurodegenerativa más frecuente asociada al envejecimiento, para la cual aún no existen terapias efectivas. Se caracteriza por la acumulación en el cerebro del péptido beta amiloide ( $A\beta$ ), que se origina a partir de la proteólisis de la proteína precursora del beta amiloide (APP). APP es una glicoproteína transmembrana capaz de mediar los efectos tóxicos producidos por  $A\beta$  mediante la interacción con la proteína Go, para la cual es clave la presencia del doblete de histidinas H657 y H658 en APP. Por otro lado, se ha visto que la desregulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular acompaña el proceso degenerativo en la EA, y está asociada, al menos en parte, a la deposición de  $A\beta$  aunque aún no se conoce el mecanismo subyacente. A partir de esto, nuestra hipótesis es que la señalización APP-Go participa en la desregulación del metabolismo de  $Ca^{2+}$  inducido por las formas agregadas de  $A\beta$  y que la sustitución de la histidina 658 por prolina en APPhp afectará esa señalización. Es por ello que se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1. Generar cultivos celulares que sobreexpresen Go $\alpha$  y APPwt o APPhp y establecer las condiciones experimentales para medir los cambios dinámicos en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ . 2. Analizar comparativamente el efecto de la señalización de APPwt-Go y APPhp-Go en la regulación de la dinámica de  $Ca^{2+}$  intracelular en respuesta a formas patológicas de  $A\beta$ . Para ello se trataron con  $A\beta_{25-35}$  cultivos de células N2a previamente transfectados con Go $\alpha$  y APPwt o APPhp y posteriormente mediante videomicroscopía se registraron los cambios en la dinámica del  $Ca^{2+}$  intracelular mediante el indicador Cal-520-AM. Si bien se observaron diferencias en el número de oscilaciones espontáneas de  $Ca^{2+}$  y la amplitud de las mismas entre las diferentes condiciones experimentales, estas no resultaron consistentes a lo largo de las distintas réplicas realizadas. A partir de estos resultados a futuro se espera poder ajustar el modelo, para obtener datos consistentes y poder reproducir fenómenos previamente descritos.

**Palabras claves:** Alzheimer, Amiloide beta, APP, Go,  $Ca^{2+}$ , Cal-520.

## **ABSTRACT**

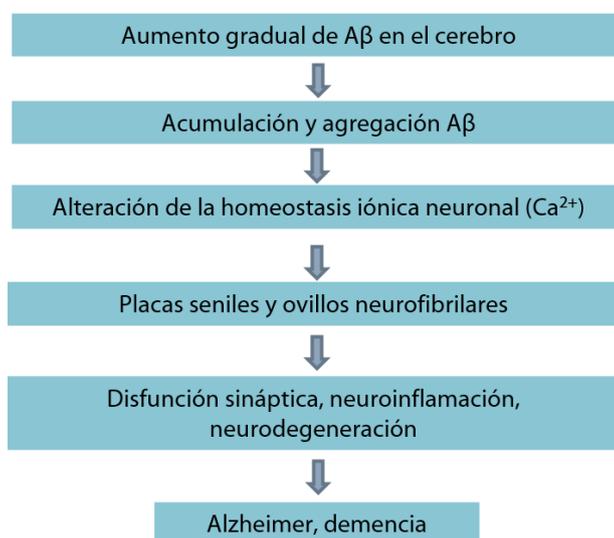
Alzheimer's disease (AD) is the most frequent neurodegenerative pathology associated with aging, for which there are still no effective therapies. It is characterized by the accumulation in the brain of amyloid beta peptide ( $A\beta$ ), which originates from the proteolysis of amyloid beta precursor protein (APP). APP is a transmembrane glycoprotein capable of mediating the toxic effects produced by  $A\beta$  through interaction with the Go protein, for which the presence of the doublet of histidines H657 and H658 in APP is crucial. On the other hand, it has been reported that the deregulation of intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis accompanies the degenerative process in AD, and is associated, at least in part, with the deposition of  $A\beta$ , although the underlying mechanism is still unknown. Therefore, we hypothesize that APP-Go signaling participates in the deregulation of  $Ca^{2+}$  metabolism induced by aggregated forms of  $A\beta$  and that the substitution of histidine 658 for proline in APPhp will affect that signaling. Hence, the following specific objectives were set: 1. Generate cell cultures that overexpress  $Go\alpha$  and APPwt or APPhp and establish the experimental conditions to measure the dynamic changes in intracellular  $Ca^{2+}$  levels. 2. Comparatively analyze the effect of APPwt-Go and APPhp-Go signaling in the regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics in response to pathological forms of  $A\beta$ . To do this, cultures of N2a cells previously transfected with  $Go\alpha$  and APPwt or APPhp were treated with  $A\beta_{25-35}$  and the changes in the dynamics of intracellular  $Ca^{2+}$  were recorded by live imaging using the Cal-520-AM indicator. Although there were differences between the different experimental conditions in the number of spontaneous  $Ca^{2+}$  oscillations and their amplitude, these were not consistent throughout the different replicates carried out. Based on these results, in the future, we expect to adjust the model, to obtain consistent data and to be able to reproduce previously described phenomena.

**Keywords:** Alzheimer, Amyloid beta, APP, Go,  $Ca^{2+}$ , Cal-520.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA), propia del ser humano, es la principal causa de demencia y la patología neurodegenerativa más frecuente asociada al envejecimiento (Alzheimer's Disease International, 2015). Afecta regiones particulares del cerebro, como el neocórtex y el hipocampo, lo cual explica el deterioro progresivo en habilidades cognitivas, como la memoria y el razonamiento, que se observan en la enfermedad (Thal *et al.*, 2002). La amplia mayoría de casos de EA son de tipo esporádico (asociados a la vejez), mientras que una baja proporción se debe a la presencia de mutaciones genéticas, caso que se conoce como Alzheimer familiar.

Una característica distintiva de la EA, tanto en su forma esporádica como familiar, es la agregación y progresiva acumulación de proteínas asociadas a la patología, particularmente el Amiloide beta ( $A\beta$ ), que forma placas extracelulares que pueden ocupar gran parte del parénquima cerebral, y la proteína tau hiperfosforilada que genera ovillos neurofibrilares a nivel intracelular. Múltiples líneas de evidencia genética, clínica y biológica apoyan la hipótesis de la agregación/acumulación de  $A\beta$  como responsable de la cascada de eventos patológicos que caracterizan la EA (conocida como “hipótesis de la cascada del amiloide beta”), incluyendo la pérdida de sinapsis, la acumulación intracelular de tau, la degeneración neuronal y el deterioro intelectual progresivo (Figura 1) (Selkoe & Hardy, 2016). El empleo de técnicas de imágenes ha demostrado que la deposición de  $A\beta$  en el cerebro antecede por casi dos décadas a la aparición los síntomas cognitivos (Selkoe & Hardy, 2016), lo cual sugiere la existencia de una ventana temporal para la aplicación de terapias que prevengan el daño generado por el  $A\beta$ . Lamentablemente, aún no se conoce ninguna terapia efectiva para ello, en gran medida porque los mecanismos celulares que subyacen al proceso degenerativo no están del todo esclarecidos.



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

A $\beta$  es un péptido de entre 40 y 43 aminoácidos que se encuentra normalmente de forma soluble en los fluidos corporales incluyendo el líquido cefalorraquídeo, y participaría en la modulación procesos fisiológicos como la excitabilidad de circuitos neuronales. Por otra parte, el A $\beta$  tiene una propensión natural a agregarse en forma de oligómeros y fibras, los cuales son patológicos e inducen disfunción y muerte neuronal (Bignante *et al*, 2013). Si bien el mecanismo de toxicidad de los agregados de A $\beta$  no ha sido aún completamente dilucidado, numerosas evidencias indican que la desregulación de la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> formaría parte de las respuestas celulares tempranas a la deposición de estos agregados patológicos (Calvo-Rodríguez *et al.*, 2020). El Ca<sup>2+</sup> intracelular es un importante segundo mensajero que regula múltiples funciones celulares, incluyendo, entre muchas otras, adhesión celular, plasticidad sináptica, la excitabilidad neuronal y procesos de aprendizaje y memoria. En determinados contextos también puede iniciar cascadas de transducción de señales que determinan la muerte celular (Demuro *et al.*, 2010). En consonancia con el rol crítico que cumple en procesos de señalización, el Ca<sup>2+</sup> se encuentra finamente regulado en las neuronas, particularmente a nivel citosólico, donde la concentración es mantenida en el rango nM (50-300 nM), mientras que en el espacio extracelular ronda 1.1 a 1.4 mM (Bagur *et al.*, 2017). Cuando la célula se activa (ante un proceso de señalización) se produce un incremento del Ca<sup>2+</sup> citosólico, como consecuencia de un aumento en la entrada desde el compartimento extracelular a través de la membrana plasmática, o por un incremento del eflujo desde reservorios internos de Ca<sup>2+</sup> como lo son el retículo endoplasmático y la mitocondria (Clapham, 2007). Cuando los cambios de la concentración de Ca<sup>2+</sup> ocurren de manera repetitiva y sin un estímulo aparente se denominan oscilaciones espontáneas (REFs) (Sneyd *et al.*, 1995).

Está bien documentado que la desregulación sostenida del Ca<sup>2+</sup> intracelular es un evento que acompaña el proceso degenerativo en la EA. Al respecto se han observado incrementados los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico en reposo, un mayor influjo por medio de la membrana plasmática y una exacerbada liberación desde el retículo que en conjunto terminan ocasionando toxicidad (Calvo-Rodríguez *et al.*, 2020). A pesar de las múltiples evidencias que apoyan la relación entre la deposición de A $\beta$  y el desbalance de la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>, el mecanismo responsable de este proceso aún está pobremente entendido.

El A $\beta$  se origina fisiológicamente por la proteólisis enzimática de la proteína Precursora de Amiloide  $\beta$  (APP). APP es una glicoproteína transmembrana de tipo 1, muy abundante en el cerebro y en neuronas. APP puede modular procesos de plasticidad neuronal, incluyendo adhesión celular, migración neuronal, crecimiento de neuritas, plasticidad sináptica, y

reciclado de receptores de neurotransmisores, entre otros. Consistente con esa posibilidad, APP tiene sitios de consenso para unión a diferentes proteínas adaptadoras que participan en modulación de la plasticidad neurítica y sináptica como Fe65 y Mint11 y para activación de proteínas heterotriméricas Go y Gs (Nishimoto *et al.*, 1993; Deyts *et al.*, 2012; Copenhaver & Kögel, 2017). Se documentó que la señalización APP-Go sería fisiológicamente relevante para la migración neuronal (Ramaker *et al.*, 2013), para modular la liberación de neurotransmisores en sinapsis excitatorias mediada por el propio A $\beta$  (Fogel *et al.*, 2014) y, sorprendentemente, también para mediar los efectos tóxicos de los agregados patológicos de A $\beta$  (Sola Vigo *et al.*, 2009; Bignante *et al.*, 2018; Antonino *et al.*, 2022). Además, se ha reportado la relevancia de APP y Go en la desregulación del Ca<sup>2+</sup> mediada por A $\beta$  (Shaked *et al.*, 2009).

Experimentos con proteínas purificadas y péptidos sintéticos, permitieron caracterizar una secuencia de 20 aminoácidos dentro del dominio intracelular de APP que activa la proteína Go, y se identificó que las histidinas 657-658 son críticas para dicha actividad (Nishimoto *et al.*, 1993). Posteriormente, se determinó que la sustitución de las histidinas 657-658 por glicina y prolina, respectivamente, previene la señalización APP-Go en cultivos celulares (Brouillet *et al.*, 1999). Es importante destacar que una mutación natural de *App* que genera la sustitución de la histidina 658 de APP por prolina (en este trabajo designaremos a esa forma mutante de APP como APPhp) fue identificada en un individuo de la etnia africana Mandinka (Guerreiro *et al.*, 2010). Por ende, surge el interés de utilizar esta forma mutante APPhp para el estudio de la señalización APP-Go, dado que la mutación se encuentra en un sitio crítico y necesario para la interacción entre ambas proteínas.

Teniendo en cuenta los reportes que asocian la desregulación del Ca<sup>2+</sup> a la deposición de A $\beta$ , y debido a que en el laboratorio del Dr. Lorenzo se obtuvieron datos experimentales que sugieren que APPhp podría ser protectora contra los efectos tóxicos del A $\beta$  (datos no publicados), en este trabajo de tesina nos propusimos establecer un modelo celular para abordar el estudio de la mutante APPhp y su relevancia en la modulación de la dinámica del Ca<sup>2+</sup> intracelular inducida por el A $\beta$ .

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El objetivo general de este proyecto es expandir el conocimiento referido a la regulación patológica de la dinámica del Ca<sup>2+</sup> intracelular en la enfermedad de Alzheimer.

Nuestra hipótesis es que la señalización APP-Go participa en la desregulación del metabolismo de  $Ca^{2+}$  inducido por las formas agregadas de  $A\beta$  y que la sustitución de la histidina 658 por prolina en APPhp afectará esa señalización.

A partir de ello, los objetivos específicos son:

1. Generar cultivos celulares que sobreexpresen  $Go\alpha$  conjuntamente con APPwt o APPhp y establecer las condiciones experimentales para medir los cambios dinámicos en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  empleando la sonda Cal-520-AM.
2. Analizar comparativamente el efecto de la señalización de APPwt-Go y APPhp-Go en la regulación de la dinámica intracelular de  $Ca^{2+}$  en respuesta a formas patológicas de  $A\beta$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Para cada reactivo utilizado en el presente trabajo se indica su procedencia y la dilución empleada en el caso de los anticuerpos.

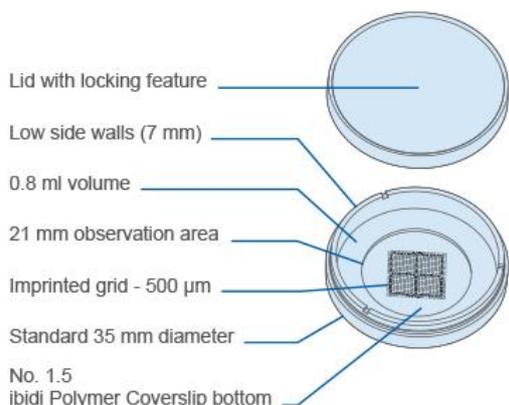
<b>Reactivo</b>	<b>Proveedor/catálogo/dilución</b>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con HEPES	Gibco #12430-054
Suero fetal bovino (SFB)	Gibco #16000-044
GlutaMAX	Gibco #A12860-01
Penicilina/estreptomicina	Gibco #15140-122
Anfotericina B	Gibco #15290-02
Hank's balanced salt solution	Gibco #14065056
Tripsina	Gibco #15090046
Polietilimimina 87 K	Universidad Nacional de Buenos Aires
FluorSave	Sigma Aldrich, San Luis, EEUU
<b>Anticuerpos</b>	
Anti-APP N-terminal (clon 22C11)	Millipore #MAB348 - Dilución 1:500
Anti-APP humano (6E10)	Dilución 1:1000
IR800 anti-ratón	Dilución 1:500
Alexa fluor488 anti-ratón	Jackson #715-545-150 - Dilución 1:500
Cy3 570 anti-ratón	Jackson #715-165-150 - Dilución 1:500
<b>Péptidos</b>	

A $\beta$ 25-35	Biopeptide Inc (San Diego, CA)
<b>Plásmidos</b>	
APPwt	Generados en el laboratorio Dr Lorenzo
APP $\Phi$	Generados en el laboratorio Dr Lorenzo
APPwt-YFP	Generados en el laboratorio Dr Lorenzo
APP $\Phi$ -YFP	Generados en el laboratorio Dr Lorenzo
Go $\alpha$	Disponible en el laboratorio Dr Lorenzo
m-Cherry	Disponible en el laboratorio Dr Lorenzo
<b>Indicador de calcio</b>	
Cal520 AM	AAT Bioquest
<b>Placa de cultivo</b>	Biofil #TCD010035

**Cultivos celulares.** Se utilizó la línea celular N2a derivada de neuroblastoma de ratón. Esta fue cultivada en medio DMEM con 25mM HEPES (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos), antibióticos, 1% penicilina/estreptomicina, y 0,1% anfotericina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera saturada de humedad con 5% CO<sub>2</sub>.

El stock de células se mantuvo en placas de cultivo de 60mm, una vez alcanzado el 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo reemplazándolo por buffer Hank's 1x (Hank's balanced salt solution, Gibco) y se incubó con tripsina 1x a 37°C por 5 minutos para realizar una disgregación enzimática. Una vez lograda la suspensión de las células se le agregó DMEM 10% SFB, y se centrifugó. Luego de descartar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en medio de cultivo, para posteriormente sembrar la cantidad de células necesarias en cada caso. El recuento se hizo mediante una cámara de Neubauer. Para los distintos experimentos que se realizaron en este trabajo las células se sembraron a una densidad de 250.000 células en placas de Petri plásticas de 35mm. Dependiendo del objetivo, en algunos casos se colocaron vidrios circulares (covers) en las placas antes de sembrar las células (para luego ser montados en un portaobjetos) mientras que para los experimentos donde se realizaron las determinaciones de Ca<sup>2+</sup> por videomicroscopía, las células se cultivaron en placas con una base de vidrio desde las cuales es posible tomar directamente las imágenes de las células vivas. En las placas utilizadas, la base de vidrio cuenta con una

grilla cuadriculada, donde cada cuadrante presenta una referencia alfanumérica, que permite identificar el campo que se observa por microscopía (Figura 1).



**Figura 2. Placas de cultivo.** Representación esquemática de las placas de cultivo utilizadas para hacer videomicroscopía. Imagen tomada de [www.ibidi.com](http://www.ibidi.com).

**Plásmidos.** Se utilizaron vectores para inducir la sobreexpresión de APP y Go, que incluyen pcDNA3.1- Go $\alpha$  que contiene el cDNA de la subunidad alfa de la proteína Go humana, pcDNA3.1-APPwt y pcDNA3.1-APP $\mu$ p conteniendo respectivamente el cDNA del APP humano salvaje de longitud completa (APP695) y de APP con una mutación que genera el cambio de una histidina (H658) por prolina resultando en una deficiencia en la interacción con Go alfa (Nishimoto *et al.*, 1993; Brouillet *et al.*, 1999). También se emplearon pcDNA3.1-APPwt:YFP, APP $\mu$ p:YFP y pcDNA3.1-m-Cherry, los primeros contienen el cDNA de APP (wt o mutado) fusionado por su extremo C-terminal a la proteína fluorescente amarilla mientras que el tercero contiene solo el cDNA de la variante *cherry* (roja) de la proteína fluorescente verde.

**Transfección.** Aproximadamente 24h después de sembradas de las células (70-80% de confluencia), los cultivos fueron transfectados agregando directamente la mezcla de ADN correspondiente (APPwt, APP $\mu$ p, APPwt-YFP, APP $\mu$ p-YFP, Go $\alpha$ , m-Cherry según el caso) con 3  $\mu$ L de polietilenimina 87 K 0,05mM (PEI, producido por Juan M. Lázaro-Martínez, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina) disueltos en 125  $\mu$ L de NaCl 0,15mM. En todos los experimentos de este trabajo se mantuvo constante la cantidad de plásmido Go $\alpha$ , siendo la variable de ajuste de co-transfección la cantidad de plásmido APPwt o APP $\mu$ p. Una vez realizada la mezcla esta se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente para luego ser incorporada a los cultivos. En los cultivos control solo se utilizó una mezcla de PEI 87 K y NaCl. Todas las determinaciones experimentales (videomicroscopía o fijación) se hicieron 24 horas después de la transfección.

**Tratamiento con A $\beta$ .** Los cultivos se trataron con agregados fibrilares del péptido sintético comercial A $\beta$ 25-35, que consiste en un fragmento del péptido beta amiloide completo. Para preparar las fibras de A $\beta$ 25-35 se diluyeron 125  $\mu$ g del péptido en 125  $\mu$ L de agua bidestilada estéril, se incubó la mezcla por 24 horas a 37°C y luego se incorporaron 125  $\mu$ L de PBS 2X, resultando en una solución de concentración 500  $\mu$ M. Los cultivos fueron tratados con estas fibras de A $\beta$ 25-35 6 horas después de la transfección, para alcanzar una concentración final de 5  $\mu$ M, mientras que como control se utilizó el vehículo.

**Fijación.** 24 horas post-transfección los cultivos fueron lavados en PBS y posteriormente incubados en una solución de paraformaldehído 4% en PBS a 37°C por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se realizaron 3 lavados con PBS y se realizó la inmunomarcación o se montaron directamente los vidrios sobre un portaobjetos cuando se utilizó APP (wt o hp) unido a la proteína fluorescente amarilla.

**Anticuerpos.** En los ensayos de inmunocitoquímica se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-APP humano (clon 6E10, 1:1000), y el anticuerpo fluorescente secundario Alexa fluor488 anti-ratón (fluorescencia verde) o Cy3 570 anti-ratón (fluorescencia roja). Para el análisis de la expresión de proteínas por Western Blot se empleó el anticuerpo primario anti-APP N-terminal (clon 22C11; 1:500; Millipore) y el anticuerpo secundario IR800 anti-ratón (1:500).

**Inmunocitoquímica.** Los cultivos celulares fueron fijados, lavados 3 veces con PBS 1X, luego permeabilizados con Tritón X-100 0,2% en PBS durante 5 minutos y bloqueados durante 1 hora a temperatura ambiente con suero de caballo (HS, por sus siglas en inglés) al 5% en PBS. Posteriormente de realizar un lavado, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-APP humano (clon 6E10, 1:1000) en HS al 1% en PBS durante toda la noche a 4°C, y luego con el anticuerpo secundario, ya sea Alexa fluor488 anti-ratón (1:500, Jackson) o Cy3 570 anti-ratón (1:500, Jackson) por 1 hora a temperatura ambiente cubiertos de la luz. Al finalizar los vidrios con las células fueron montados en un portaobjetos con 7  $\mu$ L de FluorSave (Sigma Aldrich, San Luis, EEUU) y los preparados fueron observados al microscopio y las imágenes analizadas con el programa FIJI ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).

**Análisis de expresión de proteínas por Western Blot.** Los cultivos fueron lavados con PBS a 4°C, y mantenidos en hielo para evitar la proteólisis enzimática. Las células se lisaron con 100  $\mu$ L buffer de radioinmunoensayo RIPA 1X con inhibidores de proteasas y la acción mecánica de una espátula. El lisado se recolectó en un eppendorf, se centrifugó a 14.000 rpm

por 10 minutos, y el sobrenadante resultante se diluyó en buffer Laemmli. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 95°C por 5 minutos y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida para luego ser electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5% en PBS 0,05 % tween 20, por 1 hora a temperatura ambiente en constante movimiento y luego inmunomarcadas con el anticuerpo primario anti-APP N-terminal (clon 22C11; 1:500; Millipore) en leche descremada 1% en PBS 0,05 % tween 20. Para ello se hizo una incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con agitación seguida de la incubación por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con IR800 en leche descremada 1% en PBS 0,05 % tween 20. Luego las membranas fueron visualizadas mediante el Sistema Odyssey y la intensidad de fluorescencia de las bandas obtenidas fue analizada con el programa FIJI ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)). En cada caso se tomó de referencia (valor 1) la intensidad de fluorescencia de la banda correspondiente al cultivo transfectado con 0,5ug de APPwt, y se calculó el radio de los demás en relación este.

**Microscopía.** Los preparados realizados con cultivos transfectados con APP (wt o hp) unido a la proteína YFP fueron visualizados con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE 2000, con los objetivos 20x y 60x (de inmersión), y se tomaron imágenes con la cámara ORCA-ER (Hamamatsu Corp.), la longitud de onda de excitación y el tiempo de exposición utilizados fueron 530nm y 200ms para el canal m-Cherry, y 470nm y 500ms para la proteína YFP.

Los cultivos inmunomarcados fueron visualizados en un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 con el objetivo 60x, 200ms de exposición en ambos canales (Cherry y YFP), y de forma paralela se capturaron imágenes en contraste de fase. También se tomaron imágenes con un microscopio confocal Zeiss LSM800 (CEMINCO) con los objetivos 20x y 60x, excitando con un láser de longitud de onda 561nm (para el fluoróforo rojo) y 488nm (fluoróforo verde), y se tomaron imágenes con un tiempo de exposición de 4,95 ms. Para confirmar la expresión de APPwt y APPhp por inmunofluorescencia en las mismas células en las que previamente se realizó el registro del Ca<sup>2+</sup> mediante Cal-520-AM se emplearon cajas con grillas alfanuméricas que permiten relocalizar las áreas de registro.

**Determinaciones de Ca<sup>2+</sup> por videomicroscopía.** Los cambios en la movilización del calcio libre citosólico de células en cultivo fueron analizados mediante el indicador fluorescente Cal-520-acetoxymetil, con una excitación de 493 nm y una emisión de 515 nm

(AAT Bioquest) resuspendido en dimetil sulfóxido (DMSO). La unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a Cal-520-AM repercute en un aumento de intensidad de fluorescencia. Los cultivos de células vivas fueron transportados en un incubador portátil al Centro de Micro y Nanoscopía de Córdoba (CEMINCO) manteniendo las condiciones apropiadas de temperatura y composición gaseosa. En el CEMINCO las células fueron alojadas en el incubador hasta su uso. Posteriormente las células fueron incubadas con Cal-520-AM (concentración final 4  $\mu\text{M}$ ), a 37°C durante 30 minutos. Al final de esta incubación se retiró el medio de cultivo realizando 2 lavados y posterior suspensión con un buffer de registro conteniendo en mM: 15 HEPES/NaOH, pH 7.4, 130 NaCl, 5.4 KCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 glucosa, 1  $\text{CaCl}_2$ . El registro de la dinámica del calcio citosólico se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal de fluorescencia Zeiss LSM-800 con un objetivo Plan -Apochromat 20x y tomando imágenes de 512x512 píxeles en un rango continuo de 1 cuadro cada 2,53 segundos durante 5 minutos. El Cal-520-AM fue excitado a 488 nm, y la emisión tomada a 517 nm. Luego la intensidad de fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  fue analizada empleando el software FIJI (NIH, Bethesda, MD, USA).

**Análisis de imágenes.** El análisis de las imágenes se hizo utilizando el programa FIJI ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)). En cada video se sustrajo la fluorescencia de fondo (background) y se hizo una corrección del movimiento en los ejes x-y con el plugin “Correct 3D Drift” (Parslow *et al.*, 2014). También se aplicó una corrección del bleaching en FIJI con el método de ajuste “Histogram matching” del plugin “Bleach Correction” (Miura, 2020). Una vez procesadas las imágenes se consideraron, por célula, 3 regiones de interés (o ROIs, en su sigla en inglés) de 5x5 píxeles. De cada uno de estos ROIs se obtuvieron los datos de intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo mediante la función Z-axis-Plot de FIJI. Finalmente se evaluó el cambio de fluorescencia ( $dF$ ) sobre la fluorescencia en reposo ( $F_0$ ), ( $dF/F_0$ ), en función del tiempo de registro. El valor de  $F_0$  fue obtenido mediante el promedio de los 30 valores más bajos en cada grupo de datos.

### **Análisis estadístico**

Para cada célula, se hicieron gráficos de la variación de  $dF/F_0$  en función del tiempo de cada una de las 3 áreas de interés analizadas. En cada set de datos se consideraron oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  aquellos incrementos en  $dF/F_0$  que superaron al valor del promedio más 2 desvíos estándar o más (Feliziani *et al.*, 2022). Para cada célula se promediaron los valores obtenidos

en las 3 áreas de interés de manera tal que se generó un valor único de número de oscilaciones y de amplitud de oscilación por célula.

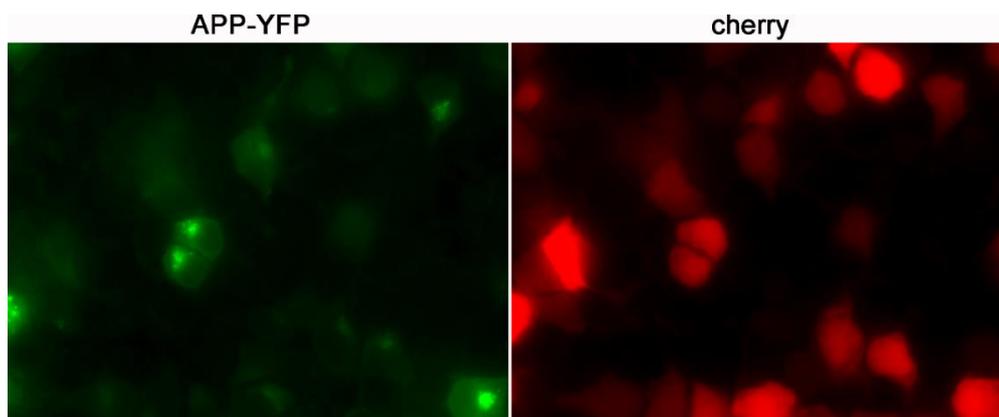
Debido a que los datos obtenidos (número de oscilaciones o amplitud) no tuvieron una distribución normal, la comparación entre tratamientos se evaluó mediante un análisis de la varianza no paramétrico Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 0,05 en el programa Infostat (<https://www.infostat.com.ar/>). Los resultados se presentan en gráficos de tipo SuperPlot (Lord *et al.*, 2020), donde además del promedio y su error asociado (desvío estándar) se presenta la dispersión de los datos analizados (cada punto representa el valor de la variable en una célula).

## RESULTADOS

### **Ajuste y optimización de la expresión de APP por microscopía.**

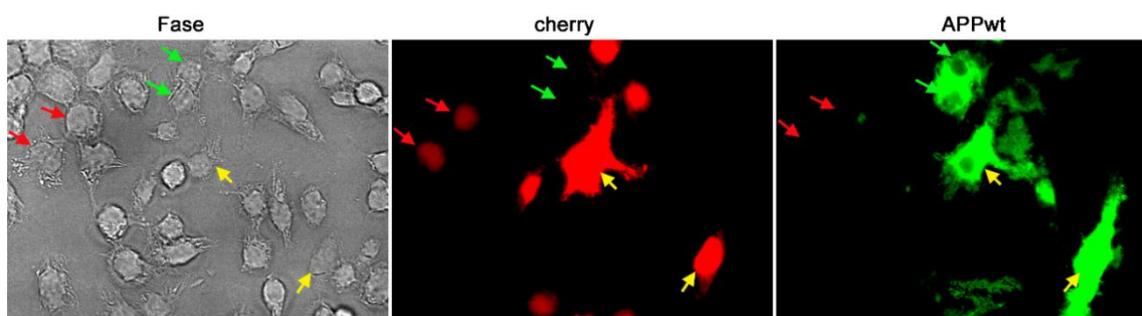
Para evaluar el rol de APP-Go en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es de crucial importancia establecer un método para identificar las células que fueron efectivamente transfectadas y, por ende, expresan APP humano, de aquellas que no lo expresan. En una primera serie de experimentos buscamos ajustar la co-expresión de una proteína reportera de transfección y APP-Go $\alpha$ . Teniendo en cuenta que Cal-520-AM tiene un pico de emisión a 517nm, consideramos que la proteína m-Cherry (Em 617nm) sería un adecuado reportero de expresión. Para facilitar el ajuste de los niveles de co-expresión de las tres proteínas (m-Cherry, APP y Go $\alpha$ ) inicialmente co-transfectamos los cultivos con Go $\alpha$ , APP:YFP y m-Cherry, a fin de identificar fácilmente las células doble transfectadas (APP:YFP/m-Cherry) sin necesidad de inmunomarcación.

Con el objetivo de optimizar la expresión de APP y lograr el mayor porcentaje de cotransfección (APP:YFP/m-Cherry), los cultivos de células N2a fueron transfectados con iguales cantidades de plásmidos Go $\alpha$  y APP:YFP (0,5  $\mu\text{g}$ ) y cantidades decrecientes de plásmido m-Cherry (0,5, 0,25, 0,125 y 0,06  $\mu\text{g}$ ). Los cultivos fueron visualizados por microscopía de fluorescencia 24h después (Figura 3). La evaluación cualitativa mostró una relación inversa entre la cantidad de m-Cherry transfectada y la proporción de células co-transfectadas APP:YFP/m-Cherry. Consecuentemente, en los siguientes experimentos se utilizó 0,06  $\mu\text{g}$  de plásmido m-Cherry por transfección.



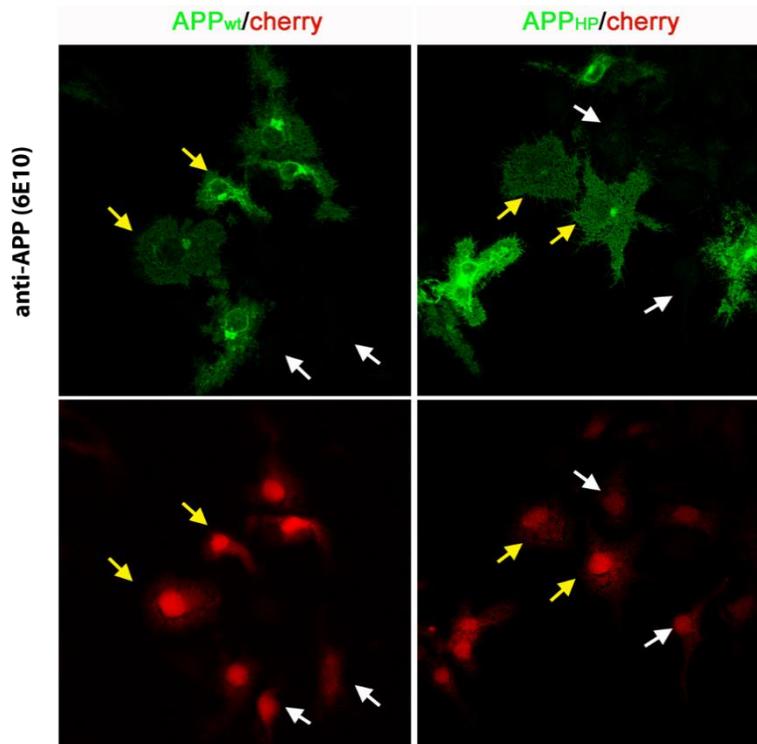
**Figura 3. Expresión de APP:YFP y m-Cherry en células N2a.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia (60x) de células N2a en cultivo transfectadas con 0,5 µg de Goα, 0,5 µg de APP:YFP, y 0,06 µg de m-Cherry. En verde se visualiza la expresión de APP:YFP y en rojo m-Cherry.

Teniendo en cuenta que el espectro de emisión de APP:YFP (Em 527 nm) podría afectar la detección del Cal-520-AM al momento de analizar las fluctuaciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular, en un segundo grupo de experimentos analizamos por inmunocitoquímica la eficiencia de m-Cherry como reportera de expresión de APP. Para ello, los cultivos de células N2a fueron transfectados con una mezcla de plásmidos de 0,06 µg de m-Cherry conjuntamente con 0,5 µg de Goα y 0,5 µg de APPwt o 0,5ug de APPhp. Posteriormente, inmunomarcamos el APP transfectado empleando un anticuerpo contra APP humano (clon 6E10), y un anticuerpo secundario fluorescente verde. Los cultivos se visualizaron por microscopía de fluorescencia y de contraste de fases. Como puede verse en la Figura 4, entre las células transfectadas se observan células co-transfectadas m-Cherry/APP, pero también se aprecia una importante proporción de células que expresan únicamente m-Cherry o APP.



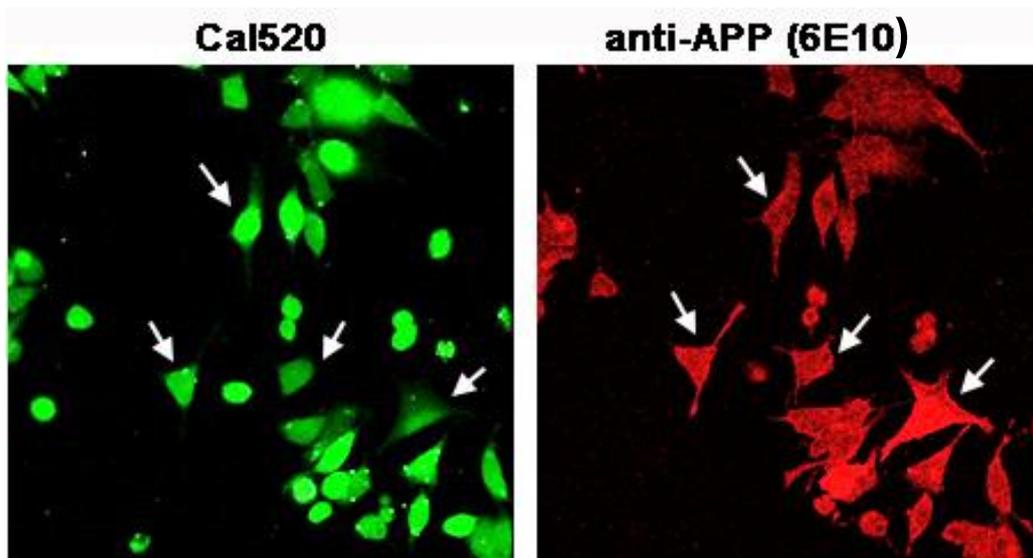
**Figura 4. Expresión de APPwt y m-Cherry en células N2a.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia y de contraste de fases (60x), de células N2a transfectadas con 0,5 µg de Goα, 0,5 µg de APPwt, y 0,06 µg de m-Cherry. En verde se visualiza la inmunofluorescencia de APP (anticuerpo 6E10) y en rojo m-Cherry. Flechas rojas, verdes, y amarillas muestran ejemplos de células que expresan solo m-Cherry, solo APP, o ambos, respectivamente.

Similares observaciones obtuvimos cuando co-transfectamos Goα, APPwt o APPhp y m-Cherry (Figura 5). Estos datos indican que la fluorescencia de m-Cherry no es un fidedigno reportero de co-expresión de APP, razón por la cual se descartó su uso.



**Figura 5. Expresión de APPwt y APPhp y m-Cherry en células N2a.** Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal (60x) de células N2a en cultivo transfectadas con 0,5  $\mu\text{g}$  de  $\text{Go}\alpha$ , 0,5  $\mu\text{g}$  de APPwt o 0,5  $\mu\text{g}$  de APPhp y 0,06  $\mu\text{g}$  de m-Cherry. En verde se visualiza la inmunofluorescencia de APP (anticuerpo 6E10) y en rojo m-Cherry. Flechas blancas indican ejemplo células que solo expresan m-Cherry, y las flechas amarillas células que expresan APP y m-Cherry

Ante la dificultad de contar con un reportero de expresión se optó por analizar las fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mayor número de células posible en cada condición (APPwt, APPhp, con o sin  $\text{A}\beta$ ), y eventualmente intentar identificar la expresión de APP exógeno a posteriori mediante inmunodetección empleando placas de cultivo con grilla alfanumérica que permiten relocalizar los campos de estudio. La Figura 6 muestra un ejemplo de la inmunodetección de APP (anticuerpo 6E10 que reconoce APP humano) en el mismo campo donde se realizó la detección de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el uso del indicador Cal-520-AM. Se puede observar que una alta proporción de las células presenta algún grado de expresión de APP. Similares proporciones se encontraron tanto en cultivos transfectados con APPwt como con APPhp (no mostrado). A partir de esta observación se optó por analizar la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  de toda la población de células de cada condición experimental sin una evaluación posterior de la co-expresión de APP.



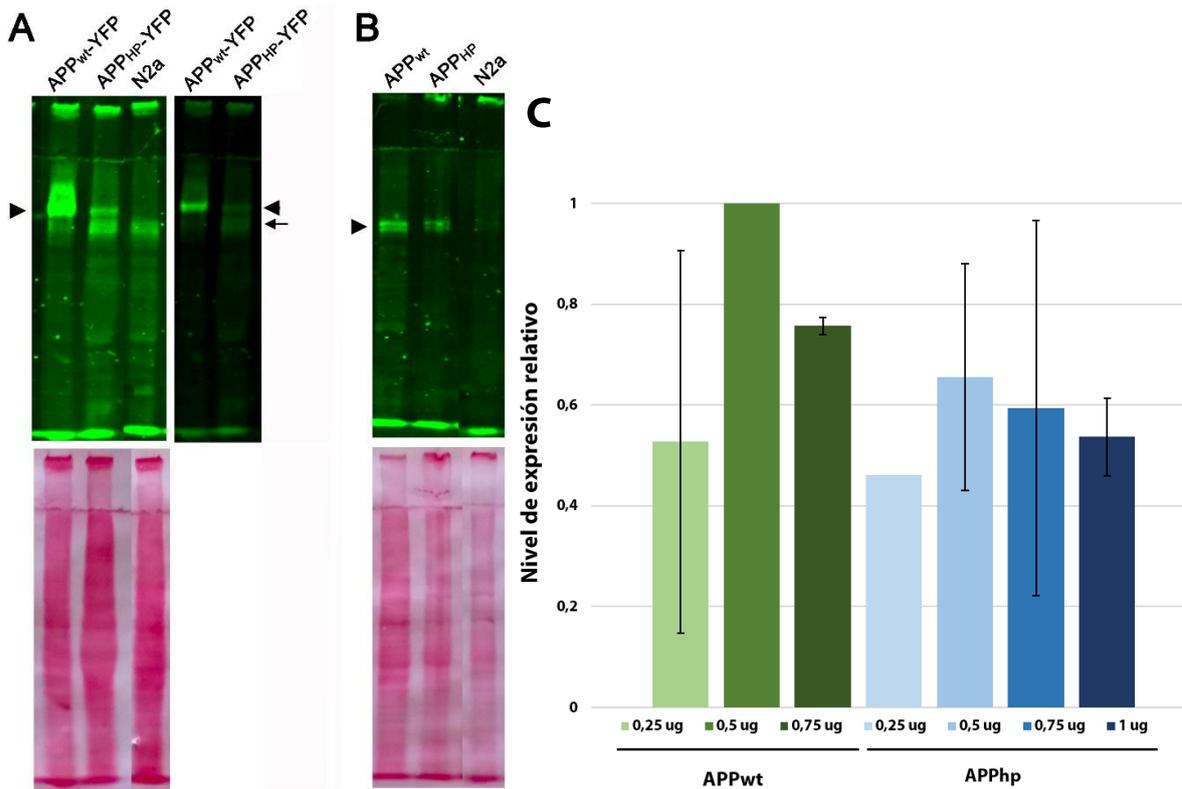
**Figura 6. Expresión de APPwt en células N2a en las que previamente se analizó la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con la sonda Cal-520.** Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal (20x) de células N2a en cultivo transfectadas con 0,5  $\mu\text{g}$  de  $\text{Go}_\alpha$ , 0,5  $\mu\text{g}$  de APPwt sin tratamiento de  $\text{A}\beta$ . A la izquierda se observan capturas de las imágenes de videomicroscopía con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Cal-520-AM en verde ( $E_m = 517 \text{ nm}$ ). A la derecha, en rojo ( $E_m = 617 \text{ nm}$ ), se observa la inmunofluorescencia de APP humano mediante inmunomarcación con el anticuerpo 6E10. Las flechas blancas, a modo de ejemplo, indican las mismas células. Note que la mayoría de las células positivas para Cal520 también expresan APPwt.

### **Ajuste de los niveles de expresión de APPwt y APPhp por Western Blot**

Para comparar el rol de APPwt y APPhp en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , es necesario conseguir similares niveles de expresión entre ambas proteínas. Para ello, los cultivos de células N2a se transfectaron con una mezcla de ADN conteniendo 0,5  $\mu\text{g}$  de  $\text{Go}\alpha$ , y una curva de cantidades crecientes de plásmidos APPwt y APPhp. Se probaron cultivos con 0,25  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$  y 0,75  $\mu\text{g}$  de APPwt y 0,25  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,75  $\mu\text{g}$ , y 1  $\mu\text{g}$  de APPhp, en los que posteriormente se evaluó la expresión de estas proteínas por Western Blot. Este procedimiento se repitió tres veces y se utilizó APPwt 0,5  $\mu\text{g}$  como condición de referencia, con respecto a la cual se intentó equiparar los niveles de expresión APPhp.

El análisis de las membranas reveladas con el anticuerpo que detecta la porción N-terminal de APP (clon 22C11) mostró bandas que verifican la presencia de la proteína en los cultivos transfectados (Figura 7 A y B). El análisis cuantitativo mostró una considerable variabilidad en los niveles de expresión tanto de APPwt como APPhp no siempre proporcional a la cantidad de plásmido utilizado en la transfección (Figura 7 C). Considerando las tres repeticiones en conjunto, se vio que 0,5  $\mu\text{g}$  de plásmido APPhp fue la cantidad con la que se lograron los niveles de expresión más semejantes a APPwt 0,5  $\mu\text{g}$ , por lo que se decidió

utilizar esa condición para realizar el análisis del  $\text{Ca}^{2+}$ .

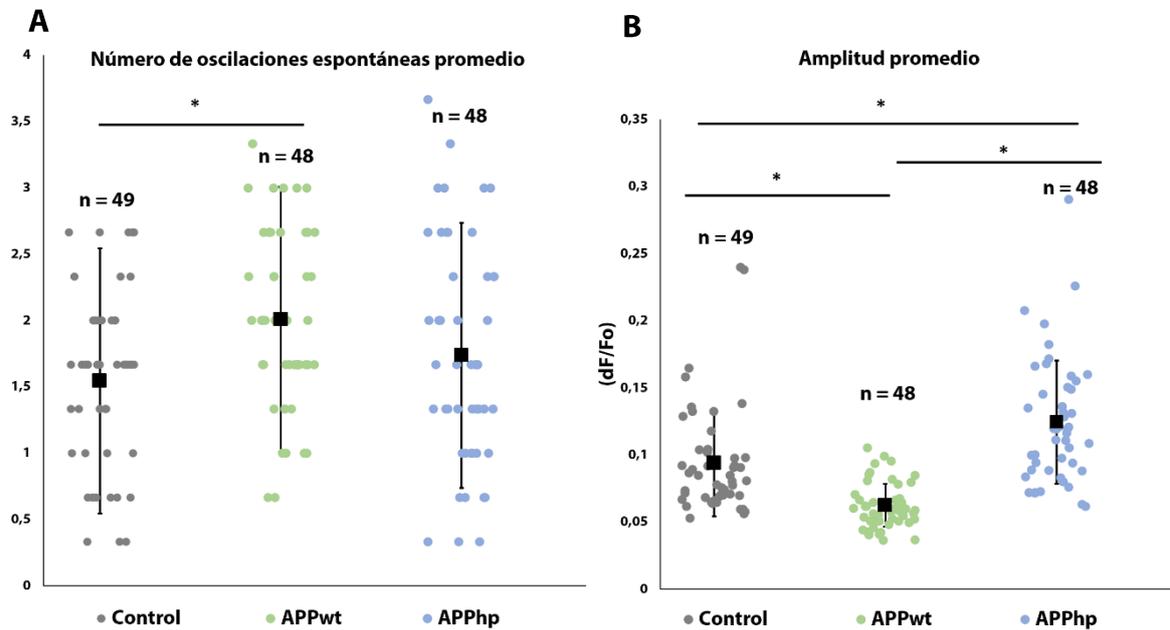


**Figura 7. Análisis de la expresión de APP por Western Blot en células N2a.** A) En la parte superior se observan las bandas correspondientes a APPwt:YFP, APPhp:YFP (cabeza de flecha) y de APP endógeno (flecha) en cultivos de células N2a transfectados y no transfectados. En la parte inferior se muestra una fotografía de la membrana teñida con rojo Ponceau (proteínas totales) B) Parte superior bandas correspondientes a APPwt, APPhp (cabeza de flecha) en cultivos de células N2a transfectados y debajo la membrana teñida con rojo Ponceau. C) Cuantificación de la expresión relativa (a APPwt 0,5  $\mu\text{g}$ ) de APP. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD de tres repeticiones independientes.

### Efecto de la sobreexpresión de APPwt y APPhp en las oscilaciones espontáneas de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

En un primer experimento evaluamos el efecto de la co-expresión  $\text{Go}\alpha$  con APPwt o APPhp en la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Para ello las células N2a fueron transfectadas con una mezcla de ADN de 0,5  $\mu\text{g}$  de  $\text{Go}\alpha$  conjuntamente con 0,5  $\mu\text{g}$  de APPwt o 0,5  $\mu\text{g}$  de APPhp o no transfectadas (control) y 24 horas luego de la transfección se realizaron los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  en células cargadas con Cal-520-AM mediante videomicroscopía en un microscopio confocal. Como se observó que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  seguían un patrón oscilatorio, para cada célula se analizó el número promedio de oscilaciones espontáneas y la amplitud promedio de las mismas. Se observó que el número de oscilaciones, en el lapso de tiempo de 5 minutos fue mayor en las células transfectadas con APPwt (media 2,01), seguido por células APPhp (media 1,74) y células control (media 1,54). La comparación estadística indicó diferencias significativas ( $p=0,0112$ ) entre el APPwt y control, pero no entre APPhp y control o APPwt

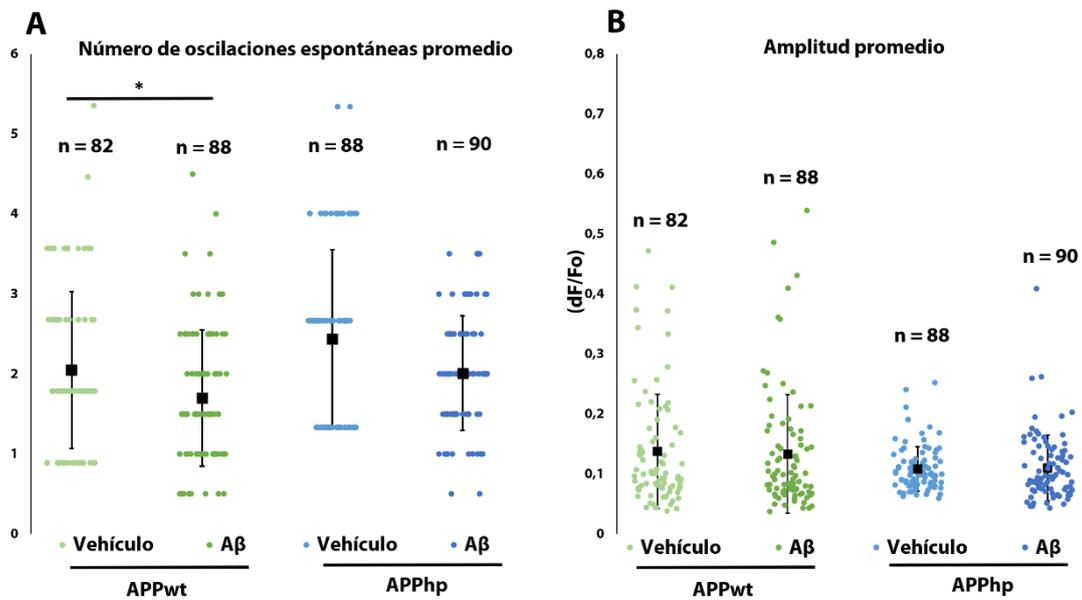
(Figura 8 A). Por el contrario, la amplitud promedio de las oscilaciones fue menor en las células APPwt, con un  $dF/F_0$  0,06, seguido del control 0,09 y del APPhp 0,12, siendo en este caso las diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre los tres grupos.



**Figura 8. Efecto de la expresión de APPwt y APPhp en la dinámica del Ca<sup>2+</sup>.** A) Se visualiza el número de oscilaciones espontáneas promedio  $\pm$  SD registradas en 5 minutos, cada punto representa el valor de la variable en una célula. \*  $p=0,0112$  B) Se representa la amplitud promedio  $\pm$  SD de las oscilaciones registradas en cada condición, cada punto representa el valor de la variable en una célula. \*  $p < 0,0001$ .

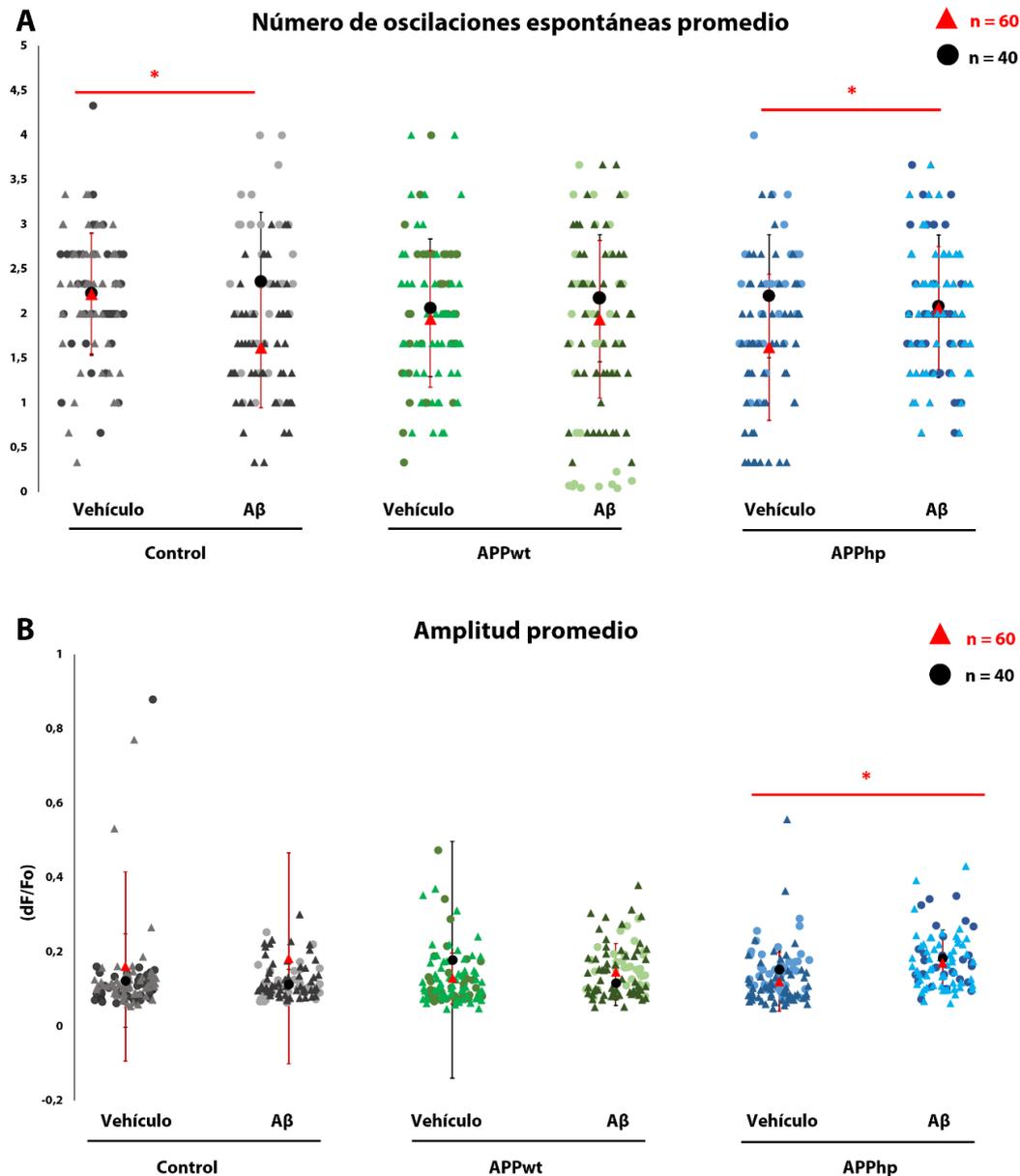
### Efecto de APPwt y APPhp en las oscilaciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> inducidas por el tratamiento con A $\beta$

Para determinar el impacto de la sobreexpresión de APPwt y APPhp en la dinámica del Ca<sup>2+</sup> intracelular inducida por el tratamiento con A $\beta$ , los cultivos de células N2a fueron transfectados con una mezcla de ADN de 0,5  $\mu$ g de Go $\alpha$  conjuntamente con 0,5  $\mu$ g de APPwt o 0,5  $\mu$ g de APPhp. Luego de 6 horas los cultivos fueron tratados con A $\beta$ <sub>25-35</sub> en una concentración 5  $\mu$ M o con su respectivo vehículo (control) y 24hs más tarde se registraron las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> en células cargadas con Cal-520-AM. Observamos que el número medio de oscilaciones fue significativamente mayor (Figura 8,  $p=0,0005$ ) en las células APPwt + vehículo (media 2,04) respecto de las APPwt + A $\beta$  (media 1,70) mientras que no hubo diferencias significativas entre APPhp + vehículo (media 2,44) y APPhp + A $\beta$  (media 2,01). Por otra parte, la amplitud de las oscilaciones no fue significativamente diferente entre los grupos y tratamientos (Figura 9,  $p=0,6906$ ).



**Figura 9. Efecto de APPwt y APPhp en las oscilaciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por del tratamiento con  $\text{A}\beta$ .** A) Se visualiza el número de oscilaciones espontáneas promedio  $\pm$  SD registradas en 5 minutos, cada punto representa el valor de la variable en una célula. \*  $p=0,0005$  B) Se representa la amplitud promedio  $\pm$  SD de las oscilaciones registradas en cada condición, cada punto representa el valor de la variable en una célula.  $p=0,6906$ .

Finalmente, se hicieron determinaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo la combinación de todas las condiciones analizadas, realizando 2 repeticiones independientes del mismo experimento. En la primera repetición (Figura 10 A y B, datos mostrados con marcadores circulares y media de color negro) no se observó efecto alguno en el número de oscilaciones espontáneas registradas, ni en su amplitud promedio. Mientras que en la segunda repetición del experimento (Figura 10 A y B, datos mostrados con marcadores triangulares y media de color rojo) se observó un mayor número de oscilaciones en la condición Control + vehículo (2,22) con respecto a Control +  $\text{A}\beta$  (1,62) y en APPhp +  $\text{A}\beta$  (2,06) con respecto a APPhp + vehículo (1,62), en ambos casos con significancia estadística (Figura 10 A,  $p<0,0001$ ). No se vieron diferencias entre células APPwt. Y en cuanto a la amplitud de las oscilaciones, solo se encontraron diferencias entre APPhp +  $\text{A}\beta$  (0,17 dF/Fo) con respecto a APPhp + vehículo (0,12 dF/Fo), (Figura 10 B,  $p<0,0001$ ), siendo mayor en el caso de APPhp +  $\text{A}\beta$ .



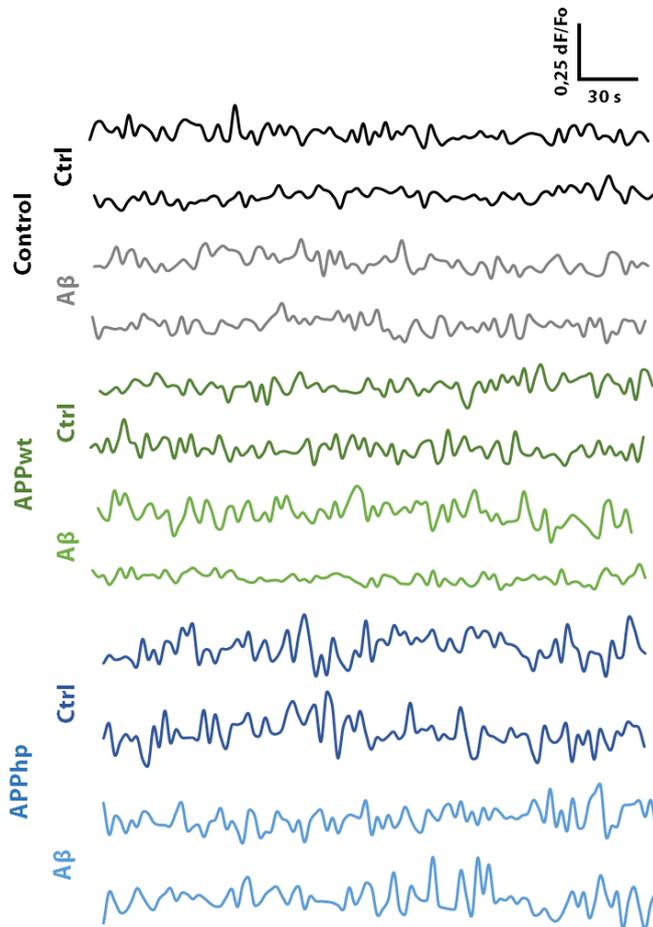
**Figura 10. Efecto de la expresión de APPwt y APPhp en la dinámica del  $Ca^{2+}$ .** Experimento con dos repeticiones independientes, marcadores circulares y media de color negro representan la primera repetición, marcadores triangulares y media de color rojo la segunda. A) Se visualiza el número de oscilaciones espontáneas promedio  $\pm$  SD registradas en 5 minutos, cada punto representa el valor de la variable en una célula. Letras distintas indican medias con significativamente diferentes  $p < 0,0001$ . B) Se representa la amplitud promedio  $\pm$  SD de las oscilaciones registradas en cada condición, cada punto representa el valor de la variable en una célula. Letras de color negro y rojo distintas representan medias significativamente diferentes en la primera y segunda repetición respectivamente  $p < 0,0001$ .

### Análisis del patrón de oscilaciones

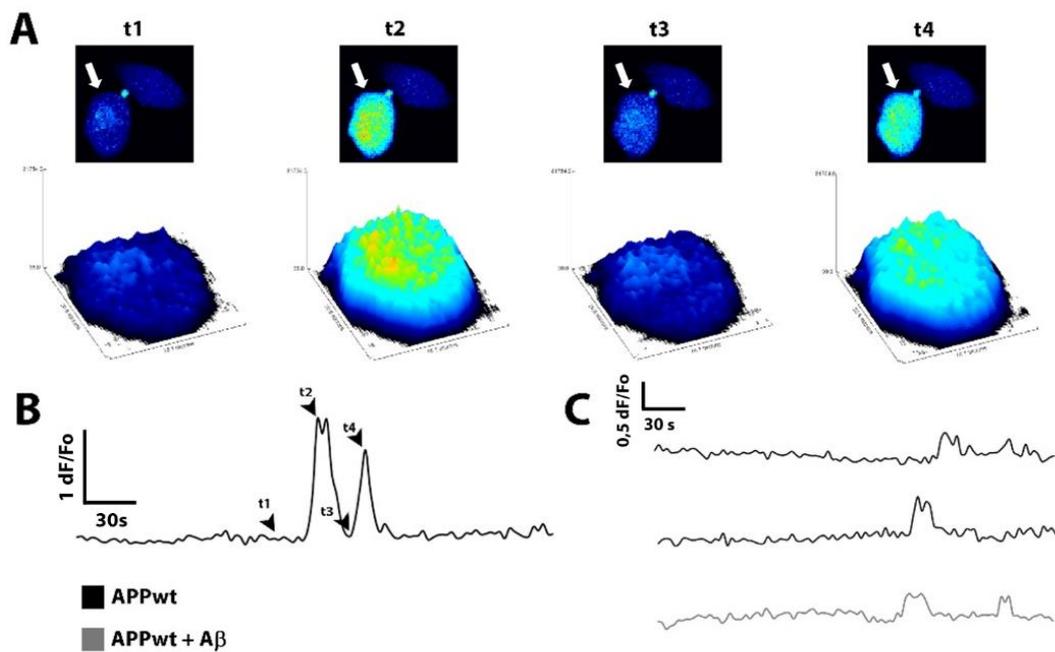
Además de analizar el número y amplitud de oscilaciones de  $Ca^{2+}$ , realizamos un análisis cualitativo de todas las trazas para determinar la apariencia de dichas oscilaciones. Como se puede ver en la Figura 11, no se observó un patrón particular evidente que pueda ser asociado específicamente con alguna condición (APPwt, APPhp o control) o tratamiento (vehículo o

A $\beta$ ). Sin embargo, en las células que expresan APPhp (con o sin tratamiento con A $\beta$ ) se apreciaron oscilaciones con una amplitud levemente mayor.

Se encontró un patrón llamativo registrado únicamente en células expresando APPwt tanto con A $\beta$  (3/29 células totales) o sin (6/30 células totales). Este consiste en 2 oscilaciones consecutivas con una amplitud mayor a la observada en la mayoría de las células. En la Figura 12 A se observan imágenes tomadas a distintos tiempos de una célula que presenta este patrón, una representación tridimensional de la variación de la intensidad de fluorescencia, y la traza dF/F<sub>0</sub> de la misma célula (Figura 12 B). Cabe destacar que este comportamiento se identificó en un solo experimento, por lo que no se hizo una cuantificación ni análisis estadístico de la presencia del patrón para todas las condiciones.



**Figura 11. Patrón de oscilaciones espontáneas.** Se muestran trazas representativas de la dinámica de Ca<sup>2+</sup> de cada condición experimental



**Figura 12. Patrón oscilatorio bifásico.** A) Imágenes de una célula ejemplo donde se presenta un patrón oscilatorio bifásico (indicada con flecha blanca) y gráficos tridimensionales que representan la intensidad de fluorescencia (azul indica menor intensidad, amarillo mayor). B) Traza de  $dF/F_0$  de la célula mostrada en A. C) Trazas de otras células que presentan el mismo tipo de patrón oscilatorio.

## DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer es la principal patología neurodegenerativa asociada al envejecimiento (Alzheimer's Disease International, 2015), cuya incidencia a nivel poblacional se espera que siga incrementando debido al sostenido aumento de la expectativa de vida humana, convirtiéndose en un creciente problema de salud pública. Pese a que es una enfermedad sobre la que se han hecho intensos trabajos de investigación, los mecanismos que subyacen al desarrollo de la patología no son del todo claros. La acumulación de formas agregadas de  $A\beta$  característica de la EA ha llevado a múltiples intentos de generar terapias dirigidas a contrarrestar este fenómeno, pero la mayoría no han sido exitosas, lo cual indica la necesidad de realizar abordajes alternativos.

La desregulación del calcio intracelular inducida por  $A\beta$  es un evento bien documentado en la enfermedad de Alzheimer, tanto en pacientes que padecen la patología, como diversos modelos *in vivo* e *in vitro* (Calvo-Rodríguez *et al.*, 2020). Además, se sabe que, a modo de mecanismo de retroalimentación positiva, esta desregulación puede a su vez facilitar la formación de más agregados de  $A\beta$  (Isaac *et al.*, 2006)

Esto, sumado a las evidencias que existen sobre toxicidad de A $\beta$  mediada por APP-Go (Sola Vigo *et al.*, 2009) ha motivado el estudio de la interrelación entre ambos fenómenos. Por lo que en el presente trabajo se buscó desarrollar un modelo celular para caracterizar el efecto de la mutación APPhp (por su implicancia en la señalización con Go) en la regulación de la dinámica intracelular de Ca $^{2+}$  ante formas agregadas de A $\beta$ .

Se pudo registrar la dinámica del Ca $^{2+}$  en forma de oscilaciones, y se comparó el número y amplitud de las mismas entre las distintas condiciones experimentales. En cuanto a los resultados obtenidos, si bien se observaron ciertos efectos del APP expresado (wt o hp) (Figura 8) y del tratamiento con A $\beta$  (Figura 9 y 10) no hubo una reproducibilidad de los mismos entre experimentos (Figuras 8, 9 y 10). En algunos casos se observó un mayor número de oscilaciones espontáneas en células APPwt + vehículo (Figura 8) y en otros en Control + vehículo (Figura 10) por ejemplo. Algo similar ocurrió al comparar la amplitud de las oscilaciones (Figura 9 y 10). Esto dificulta el establecimiento de una respuesta clara del Ca $^{2+}$  en el contexto estudiado en este trabajo.

Por otra parte, es de destacar que en el modelo desarrollado no fue posible reproducir efectos ampliamente documentados tanto de APPwt como A $\beta$ . Dentro de estos se encuentran mayores niveles basales, y frecuencia de oscilaciones transitorias de calcio en las proximidades de las placas de A $\beta$  en modelos *in vivo* (Busche *et al.*, 2008; Kuchibhotla *et al.*, 2008), efecto que también es observable ante la aplicación exógena del péptido (Ornath *et al.*, 2017). En cultivos primarios de neuronas, se ha visto que las formas agregadas de A $\beta$  producen un incremento de la entrada de calcio desde el espacio extracelular a través de la membrana plasmática, por medio de canales activados por voltaje (Pourbadie *et al.*, 2015), receptores glutamatérgicos NMDA (Ronicke *et al.*, 2011; Shankar *et al.*, 2008) y formación de canales catiónicos del mismo A $\beta$  (Demuro *et al.*, 2010), y también una mayor liberación de Ca $^{2+}$  desde el retículo por medio de receptores de inositol trifosfato (IP3Rs) y rianodina (RyRs) (Ferreiro *et al.*, 2004; Shtifman *et al.*, 2008; Schapansky *et al.*, 2007). Particularmente en Martinsson *et al.* (2022) se ha podido evidenciar que tanto la expresión de APPwt como el tratamiento con A $\beta$ , de manera conjunta o independiente inducen una mayor frecuencia de oscilaciones y una mayor amplitud de las mismas con respecto a sus respectivos controles. En este trabajo se analizaron ambas variables, pero no se encontró el mismo resultado. Estas discrepancias pueden ser en parte por el modelo celular utilizado, dado que en la gran mayoría de reportes donde se estudia la dinámica de Ca $^{2+}$  citosólico en el contexto de la enfermedad de Alzheimer se utilizan cultivos primarios de neuronas, o bien experimentos con modelos *in vivo*, que difieren notablemente de la línea celular utilizada en

este trabajo. En los pocos estudios de estos fenómenos en células N2a que se pudieron encontrar, el único efecto reportado indica que la sobreexpresión de APPwt produce una disminución de la entrada de calcio dependiente de la depleción de los reservorios internos (mecanismo conocido como SOCE “store operated calcium entry”) (Niu *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2012) con respecto a cultivos no transfectados. Si bien en este trabajo no se estudió específicamente este mecanismo, teniendo en cuenta los antecedentes, los cambios en los patrones oscilatorios encontrados aquí (Figura 9) quizás podrían atribuirse a una disminución del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. Este dato puede tenerse en cuenta para futuros estudios en células N2a, donde se comparen SOCE entre cultivos APPwt y APPhp mediante el uso de tapsigargina, un inhibidor de la bomba SERCA encargada de transportar  $\text{Ca}^{2+}$  de forma activa hacia el retículo.

Otro factor importante es la ventana temporal en la que se evalúan las respuestas del  $\text{Ca}^{2+}$ , en este trabajo se estudiaron efectos crónicos tanto de la transfección como del tratamiento con A $\beta$  (el análisis se hizo aproximadamente 24 horas después) pero en muchos casos los cambios se han visto solo en un plazo corto (aproximadamente 5 horas) luego de aplicado el tratamiento (Ornath *et al.*, 2017; Shankar *et al.*, 2008), ya que después de cierto tiempo las células logran una adaptación. Por esto, sería conveniente sumar a las determinaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  registros en un tiempo corto, para poder detectar la presencia de efectos agudos.

Dentro de los efectos conocidos del A $\beta$  se encuentra también el incremento de los niveles de calcio citosólico en reposo (Kuchibhotla *et al.*, 2008, Calvo-Rodríguez *et al.*, 2020). Esta característica no fue estudiada por nosotros, por lo que si bien no se vieron diferencias consistentes en los cambios dinámicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , puede que los cultivos con distintos tratamientos hayan diferido en sus niveles basales. Metodológicamente, para la determinación del  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo se deben establecer los valores de fluorescencia máximo y mínimo del indicador de calcio para referenciar el valor de la condición basal. Para ello es necesario un ionóforo (por ejemplo, ionomicina), con el que no se contaba al momento de realizar este trabajo, pero que puede emplearse en el futuro para evaluar diferencias entre condiciones y tratamientos.

En cuanto a las características de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , se observaron patrones de oscilaciones espontáneas similares entre las condiciones analizadas. Estas oscilaciones pueden haber sido generadas tanto por un ingreso desde el compartimento extracelular por medio de distinto tipo de canales, o por la liberación desde reservorios internos como el retículo endoplasmático a través de receptores rianodina (RyRs) o de inositol trifosfato (IP3Rs) (Berridge, 2016; Sneyd *et al.*, 1995), por lo que sería interesante sumar experimentos sin

Ca<sup>2+</sup> en el buffer de registro para poder evidenciar para cada condición analizada, la procedencia del Ca<sup>2+</sup> y poder profundizar sobre mecanismo de generación de las oscilaciones. El patrón peculiar observado en la condición APPwt (Figura 11), podría estar implicando un proceso diferente, como es la liberación de calcio inducida por calcio, que funciona como un mecanismo de retroalimentación positiva y que es mediado sobre todo por los IP3Rs (Demuro *et al.* 2020).

La falta de reproducibilidad de los datos obtenidos entre experimentos que se evidenció en este trabajo, da cuenta de variables que no han podido ser controladas de manera sistemática. Algunas de ellas pueden ser, la sobreexpresión de Go<sub>α</sub>, que, si bien se mantuvo como un factor constante en todos los experimentos, no se comprobó su nivel de expresión dado que este ya había sido estandarizado en el laboratorio del Dr. Lorenzo. En próximos estudios, se pueden incorporar ajustes de la expresión de Go<sub>α</sub>, de la misma forma en que se hizo para APP en este trabajo.

Otro factor de variación puede ser la presencia de APP de ratón, generado endógenamente por las células N2a que puede estar enmascarando alguna respuesta específica del APP humano (Shaked *et al.* 2009), una solución a ese problema sería la utilización de células que no expresen APP como como la línea celular B103.

Por último, creemos que la mayor variabilidad se puede estar introduciendo por la metodología de transfección para inducir la sobreexpresión de APP y Go y la incerteza a la hora de identificar y enfocar el análisis en células transfectadas con APP por no poseer un reportero de transfección. Para el último punto, de forma ideal se deberían usar vectores bicistrónicos, que expresen APP y alguna molécula marcadora (con fluorescencia distinta al verde) de manera simultánea.

La transfección con plásmidos si bien permitió la sobreexpresión de APP de forma exitosa (Figura 6), es una técnica que presenta varios inconvenientes. Por un lado, como bien se pudo apreciar en la realización de este trabajo fue muy difícil manipular de forma dirigida los niveles de expresión. De modo que, aunque se ajusten las cantidades de ADN que se aplican a los cultivos, no es posible tener una certeza de la magnitud de la expresión de la proteína. Si bien no son muchos los factores que se pueden modificar, a fin de ajustar la técnica, se puede probar la utilización de lipofectamina en lugar de PEI 87K. Además, la transfección implica someter a las células a un estado que fisiológicamente no es comparable a las condiciones que se encuentran *in vivo*. Dado que el vector cuenta con un promotor fuerte, las células no tienen la capacidad de regular la expresión de la proteína, lo cual puede ser un estímulo estresor y por ende generar efectos debidos a un artefacto de técnica. Otro

inconveniente ligado al proceso de transfección, es que no todas las células de un cultivo incorporan el plásmido, y las que sí, pueden hacerlo de manera asincrónica, introduciendo aún más incertezas en el modelo. Por estas razones (problemas con la transfección), y para trabajar en consonancia con otros grupos de investigación que estudian la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en relación a la EA, es que a futuro se pretende cambiar el modelo celular, y utilizar neuronas humanas derivadas de células madre pluripotentes inducidas (o iPSCs “induced pluripotent stem cells” en inglés) que se están desarrollando en el laboratorio del Dr. Lorenzo. Además de células con genotipo wt, se cuenta con iPSCs modificadas genéticamente que poseen la mutación puntual APPhp en su genoma nuclear. Las ventajas de utilizar este modelo radican en que son células que expresan APP humano de manera endógena, por lo que no es necesario un proceso de transfección ni habría efectos artefactuales relacionados a la sobreexpresión de la proteína y el hecho de que se trata de células humanas (y no de ratón como la línea N2a). Considerando que la EA es una enfermedad propia de nuestra especie, este modelo resulta mucho más prometedor.

Por último, existen reportes de que la toxicidad inducida por  $\text{A}\beta$  depende de la señalización APP-Go e involucra una desregulación del calcio intracelular (Shaked *et al.*, 2009) y también se ha visto que la unión de un anticuerpo a APPwt (de forma similar a lo que hipotetiza que hace  $\text{A}\beta$ ) induce muerte neuronal mediada por un aumento en el calcio citosólico (Bouron *et al.*, 2004). Por lo que existe evidencia que justifica que se siga estudiando la relevancia señalización APP-Go en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del contexto de la enfermedad de Alzheimer.

En conclusión, en este trabajo se establecieron las condiciones experimentales para el estudio de la dinámica intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en células N2a, y se evaluó el rol de la señalización APP-Go en la toxicidad inducida por  $\text{A}\beta$  por medio de la expresión de APPwt, APPhp, y posterior análisis de los cambios en el calcio. En un futuro se espera ajustar aún más variables que son susceptibles de ser controladas, evaluar otros aspectos relativos a la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , como los niveles en reposo y SOCE, y trasladar el estudio a modelos celulares como neuronas derivadas de iPSCs que otorguen resultados más confiables y relevantes a fin de aportar al conocimiento de los mecanismos celulares que subyacen a la enfermedad de Alzheimer.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. 2015. World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends.

- ANTONINO M., P. MARMO, C. L. FREITES, G. E. QUASSOLLO, M. A. SÁNCHEZ, A. LORENZO & E. A. BIGNANTE. 2022. A $\beta$  Assemblies Promote Amyloidogenic Processing of APP and Intracellular Accumulation of A $\beta$ 42 Through Go/G $\beta$  $\gamma$  Signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Vol. 10.
- BAGUR, R. & HAJNÓCZKY, G. 2017. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol. Cell*, 66, 780–788
- BIGNANTE E. A., F. HEREDIA, G. MORFINI, & A. LORENZO. 2013. Amyloid  $\beta$  precursor protein as a molecular target for amyloid  $\beta$ -induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 34(11):2525-37.
- BIGNANTE E. A., N. E. PONCE, F. HEREDIA, J. MUSSO, M. C. KRAWCZYK, J. MILLÁN, G. F. PIGINO, N. C. INESTROSA, M. M. BOCCIA, & A. LORENZO. 2018. APP/Go protein G $\beta$  $\gamma$ -complex signaling mediates A $\beta$  degeneration and cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neurobiology of Aging*. 64:44-57.
- BERRIDGE M. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol Rev* 96: 1261–1296
- BROUILLET, E., TREMBLEAU A., GALANAUD D., VOLOVITCH M., BOUILLOT C., VALENZA C., PROCHIANTZ A., & ALLINQUANT B. 1999. The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. *J Neurosci* 19, 1717-1727
- BUSCHE, M. A., G. EICHHOFF, H. ADELSBERGER, D. ABRAMOWSKI, K. H. WIEDERHOLD, C. HAASS, M. STAUFENBIEL, A. KONNERTH & O. GARASCHUK. 2008. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321, 1686–1689
- CALVO-RODRIGUEZ M., E. K. KHARITONOVA, & B. J. BACSKA. 2020. Therapeutic Strategies to Target Calcium Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Cells*. 9, 2513.
- CLAPHAM D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131
- COPENHAVER P. F., & D. KÖGEL. 2017. Role of APP Interactions with Heterotrimeric G Proteins: Physiological Functions and Pathological Consequences *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Vol. 10.
- DEMURO A., I. PARKER & G. E. STUTZMANN. 2010. Calcium Signaling and Amyloid Toxicity in Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 238.
- DESHPANDE, A., E. MINA, C. GLABE, & J. BUSCIGLIO. 2006. Different conformations of amyloid  $\beta$  induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J. Neurosci*. 26, 6011–6018

- FELIZIANI C., M. FERNANDEZ, G. QUASSOLLO, D. HOLSTEIN, S. M. BAIRO, J. C. PATON, A. W. PATON, J. DE BATISTA, J. D. LECHLEITER & M. BOLLO. 2022. Ca<sup>2+</sup> signalling system initiated by endoplasmic reticulum stress stimulates PERK activation. *Cell Calcium*. Vol. 106.
- FERREIRO, E., C. R. OLIVEIRA, & C. PEREIRA. 2004. Involvement of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid-beta peptide. *J. Neurosci. Res.* 76, 872–880
- FOGEL H., S. FRERE, O. SEGEV, S. BHARILL, I. SHAPIRA, N. GAZIT, T O'MALLEY, E. SLOMOWITZ, Y. BERDICHEVSKY, D. M. WALSH, E. Y. ISACOFF, J. A. HIRSCH, & I. SLUTSKY. 2014. APP Homodimers Transduce an Amyloid- $\beta$ -Mediated Increase in Release Probability at Excitatory Synapses. *Cell Reports*. 7(5):1560-6.
- GUERREIRO R. J., M. BAQUERO, R. BLESA, M. BOADA, J. M. BRÁS, M. J. BULLIDO, A. CALADO, R. CROOK, C. FERREIRA, A. FRANK, T. G. ISLA, I. HERNÁNDEZ, A. LLEÓ, A. MACHADO, P. MARTÍNEZ-LAGE, J. MASDEU, L. MOLINA-PORCEL, J. L. MOLINUEVO, P. PASTOR, J. PÉREZ-TUR, R. RELVAS, C. R. OLIVEIRA, M. H. RIBEIRO, E. ROGAEVA, A. SA, L. SAMARANCH, R. SÁNCHEZ-VALLE, I. SANTANA, L. TÀRRAGA, F. VALDIVIESO, A. SINGLETON, J. HARDY & J. CLARIMÓN. 2010. Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiology of Aging*, Vol. 31. 725-731.
- HILLE B. 1992. G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9, 187–195
- ISAAC A. M., D. B. SENN, M. YUAN, J. P. SHINE, AND B. A. YANKNER, B. 2006. Acceleration of amyloid  $\beta$ -peptide aggregation by physiological concentrations of calcium *J. Biol. Chem.* 281, 27916–27923.
- KUCHIBHOTLA, K. V., GOLDMAN, S. T., LATTARULO, C. R., WU, H. Y., HYMAN, B. T., & BACSKAI, B. J. 2008. A $\beta$  plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* 59, 214–225
- LORD SJ, KB VELLE, R DYCHE MULLINS, LK FRITZ-LAYLIN. 2020. SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology. *J Cell Biol* 1;219
- MA T., Y. NIU, ZHAO CHANG, Z. SU, Q. AO, X. ZHANG, N. ZHAO, & Y. GONG. 2012. Amyloid precursor protein-mediated modulation of capacitive calcium entry. *Chinese Science Bulletin*.

- MARTINSSON I., QUINTINO L., GARCIA M. G., KONINGS S C., TORRES-GARCIA L., SVANBERGSSON A., Oliver STANGE O., ENGLAND R., DEIERBORG. T, LI J., LUNDBERG C. & GOURAS G. K. 2022. A $\beta$ /Amyloid Precursor Protein-Induced Hyperexcitability and Dysregulation of Homeostatic Synaptic Plasticity in Neuron Models of Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* Vol 14.
- MIURA K. 2020. Bleach correction ImageJ plugin for compensating the photobleaching of time-lapse sequences. *F1000Research*, 9, 1494.
- NISHIMOTO I., T. OKAMOTO, Y. MATSUURA, S. TAKAHASHI, T. OKAMOTO, Y. MURASHAMA, & E. OGATA. 1993. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein Go. *Nature* 362, 75–79.
- NIU Y., Z. SU, C. ZHAO, B. SONG, X. ZHANG, N. ZHAO, X. SHENC & Y. GONG, 2009. Effect of amyloid on capacitive calcium entry in neural 2a cells. *Brain Research Bulletin*
- ORNATH M. A, E. HUDRY, J. R. BOIVIN, T. HASHIMOTO, S. TAKEDA, K. V. KUCHIBHOTLA, S. HOU, C. R. LATTARULO, A. M. BELCHER, N. SHAKERDGE, P. B. TRUJILLO, A. MUZIKANSK, R. A. BETENSKY, B. T. HYMAN & B. BACSKAI. 2017. Soluble oligomeric amyloid- $\beta$  induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain. *Molecular Neurodegeneration*.
- PARSLOW A., A. CARDONA & R.J. BRYSON-RICHARDSON. 2014. Sample drift correction following 4D confocal time-lapse imaging. *J Vis Exp.* (86).
- POURBADIE, H.G., N. NADERI, N. MEHRANFARD; M. JANAHMADI, F. KHODAGHOLI., F. MOTAMEDI. 2015. Preventing Effect of L-Type Calcium Channel Blockade on Electrophysiological Alterations in Dentate Gyrus Granule Cells Induced by Entorhinal Amyloid Pathology. *PLoS ONE*, 10, e0117555.
- RAMAKER J. M, T. L. SWANSON, & F. PHILIP F. COPENHAVER. 2013. Amyloid Precursor Proteins Interact with the Heterotrimeric G Protein Go in the Control of Neuronal Migration. *The Journal of Neuroscience*. 33(24): 10165–10181.
- RONICKE, R.; M. MIKHAYLOVA, S. RONICKE, J. MEINHARDT, U- H. SCHRODER, M. FANDRICH, G. REISER, M. R. KREUTZ, & K. G. REYMANN. 2011. Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol. Aging*, 32, 2219–2228
- SCHAPANSKY J., OLSON, K., VAN DER PLOEG, R., & GLAZNER, G. 2007 *Exp. Neurol.* 208, 169–176

- SELKOE, D. J., & J. HARDY. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*. Vol. 8-No 16.
- SHAKED G. M., S. CHAUV, K. UBHI, L. A. HANSEN, & E. MASLIAH. Interactions between the amyloid precursor protein C-terminal domain and G proteins mediate calcium dysregulation and amyloid b toxicity in Alzheimer's disease. *The FEBS Journal*.
- SHTIFMAN, A., WARD, C. W., LAVER, D. R., BANNISTER, M. L., LOPEZ, J. R., KITAZAWA, M., LAFERLA, F. M., IKEMOTO, N., & QUERFURTH, H. W. 2008. Amyloid- $\beta$  protein impairs  $Ca^{2+}$  release and contractility in skeletal muscle *Neurobiol. Aging*
- SOLA VIGO F., G. KEDIKIAN, L. HEREDIA, A. D. AÑEL, A. L. ROSA, & A. LORENZO. 2009. Amyloid-beta precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid beta through Go protein activation. *Neurobiology of Aging* 30(9):1379-92.
- SNEYD A., J. KEIZER, & M. J. SANDERSON.1995. Mechanisms of calcium oscillations and waves: a quantitative análisis. *The FASEB Journal*. Vol 9.
- THAL, D. R., RÜB, U., ORANTES, M., & BRAAK, H. 2002. Phases of A $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.