

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

**EFECTO DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE
FIBRILAR SOBRE LA HOMODIMERIZACIÓN DE
LA PROTEÍNA PRECURSORA DE BETA
AMILOIDE.**

Tesinista: Musso, Juliana.

Director: Dra. Bignante, Anahi.

**Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín
Ferreyra**

INIMEC-CONICET-UNC

**EFFECTO DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE FIBRILAR SOBRE LA
HOMODIMERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DE BETA
AMILOIDE.**

Tribunal evaluador:

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

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

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

Calificación:

Fecha:.....

Abreviaturas.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

APP: Proteína precursora del amiloide beta.

A β : Amiloide beta.

CTF: Fragmento C-terminal.

CAMKII: Promotor proteína quinasa dependiente de Calcio/ Calmodulina II.

CAMKII-APP-GFP: Plásmido que expresa APP fusionado a la proteína verde fluorescente, bajo el control del promotor CAMKII.

CAMKII-APP-Ch: Plásmido que expresa proteína APP fusionado a la proteína Cherry fluorescente, bajo el control del promotor CAMKII.

YFP: Proteína amarilla fluorescente.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DIV: Días in vitro.

FRET: Transferencia de Energía por Resonancia de Förster.

Em: Eficiencia media de FRET.

ROIs: Regiones de interés.

ANOVA: Análisis de varianza.

SEM: Error estándar.

CMV: Citomegalovirus.

Índice.

Contenido:

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Materiales y Métodos	14
Purificación y amplificación de plásmidos	14
Cultivos hipocampales primarios	15
Puesta a punto del método de transfección de los plásmidos	15
Coexpresión de los plásmidos	16
Tratamientos	17
Técnica de FRET por fotoblanqueo del aceptor	17
Análisis estadístico	18
Resultados	18
Purificación de los plásmidos	18
Puesta a punto del método de transfección de los plásmidos	19
Coexpresión de los plásmidos	21
Efecto del A β en la Homodimerización APP-APP	22
Discusión y Conclusión	24
Bibliografía	28

Resumen.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las patologías de mayor interés e importancia médica en la actualidad. Numerosos estudios científicos se han desarrollado con el fin de encontrar técnicas de diagnóstico temprano y terapias eficientes que modulen el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, tal meta aún no se ha alcanzado.

Varios estudios sugieren que APP, además de ser la única fuente de A β , actuaría como un receptor de sus formas agregadas, de manera tal que muchos de sus efectos neurotóxicos están ligados a la interacción A β -APP. Así, el A β fibrilar se une a APP y activa la proteína Go y al complejo $\beta\gamma$.

El interés de este trabajo, es demostrar que la multimerización de APP inducida por A β agregado, es un evento clave para la activación de la proteína Go y su cascada de señalización aguas abajo, que concluiría en neurotoxicidad.

Para ello, se caracterizó la expresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Cherry, mediante transfecciones en cultivos hipocampales primarios. Se estudiaron tres variables: edad de las neuronas, concentración de los plásmidos utilizados y tiempo de expresión de los mismos, para establecer las condiciones en la que se logre una mayor eficiencia en la transfección. Con estas condiciones establecidas, posteriormente se analizó el efecto de A β fibrilar sobre la homodimerización de APP. Se cotransfectaron los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch en cultivos hipocampales primarios control y tratados con A β fibrilar, y se comparó el grado de homodimerización de APP entre ambos tratamientos, a través de la técnica de FRET en su variante fotoblanqueo del aceptor. Los resultados muestran que existe FRET entre APP-GFP y APP-Ch en los cultivos hipocampales primarios tratados con vehículo, lo cual indica interacción física entre ambas proteínas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la eficiencia media de FRET (E_m), entre el grupo tratado con vehículo (control) y el tratado con A β . Esto podría sugerir que, en nuestras condiciones experimentales, el APP exógeno se expresa basalmente dimerizado

desde la vía secretoria; o bien, que el evento de dimerización no es modulable mediante el tratamiento con A β .

Palabras Claves: Alzheimer, A β , APP, Homodimerización, Go, FRET.

Abstract.

It is widely accepted that in Alzheimer's disease (AD), beta-amyloid peptide (A β) begins to accumulate extracellularly in the brain giving rise to neurotoxic aggregates. New evidence suggests that A β precursor protein (APP) would act, in addition to A β source, as a receptor for aggregated forms of the peptide. The interest of this work is to demonstrate that APP multimerization induced by aggregated A β is a key event for the activation of Go protein and its downstream signaling cascade. Thus, the plasmids CAMKII-APP-GFP and CAMKII-APP-Cherry were co-transfected into primary hippocampal cultures, controls and treated with fibrillar A β , and the degree of homodimerization of APP was compared between both treatments through the FRET technique, in its variant of photobleaching of the acceptor.

The results showed that in the primary hippocampal cultures treated with vehicle there would be physical interaction between APP-GFP and APP-Ch proteins. However, no significant differences were observed in FRET mean efficiency (Em) between the vehicle (control) and A β treated groups. This may suggest that, in our experimental conditions, exogenous APP is expressed primarily dimerized from the secretory pathway; or that the dimerization event is not modifiable by treatment with A β .

Introducción.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia ligada al envejecimiento. Se caracteriza por una progresiva disminución de las capacidades cognitivas, más comúnmente involucrando a la memoria episódica, y a las habilidades motoras que conducen a un deterioro en la vida social y realidad ocupacional del paciente.

La EA se identificó por primera vez hace más de 100 años, pero la investigación sobre sus síntomas, causas, factores de riesgo y tratamiento ha ganado impulso sólo en los últimos 30 años (Alzheimer's Association 2014). Existe un gran interés de la comunidad científica en el desarrollo de técnicas de diagnóstico temprano y terapias que eviten y/o modulen el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, esto aún no se ha logrado (Karran y col. 2011).

Se conoce que menos del 1% de los casos de EA son familiares, causados por ciertas mutaciones de sustitución de aminoácidos en la proteína precursora del amiloide beta (APP), presenilina-1 o presenilina-2. Los restantes, más del 99% de los casos, representan la forma esporádica de la EA, aparentemente causada por varios factores etiológicos, cuya naturaleza sigue siendo incierta (Iqbal y col 2014).

Está ampliamente aceptado que en la EA el péptido amiloide beta ($A\beta$) comienza a acumularse extracelularmente en el cerebro dando lugar a agregados, las que se conocen como placas seniles. Esta deposición del $A\beta$, es quien desencadena una cascada de eventos neurotóxicos responsables de los signos y síntomas de la enfermedad (Hardy y Selkoe 2002). Tales eventos implicarían la reducción en la conectividad sináptica, la hiperfosforilación de la proteína Tau con la consecuente formación de ovillos neurofibrilares intracelulares y finalmente la muerte neuronal (Figura 1).

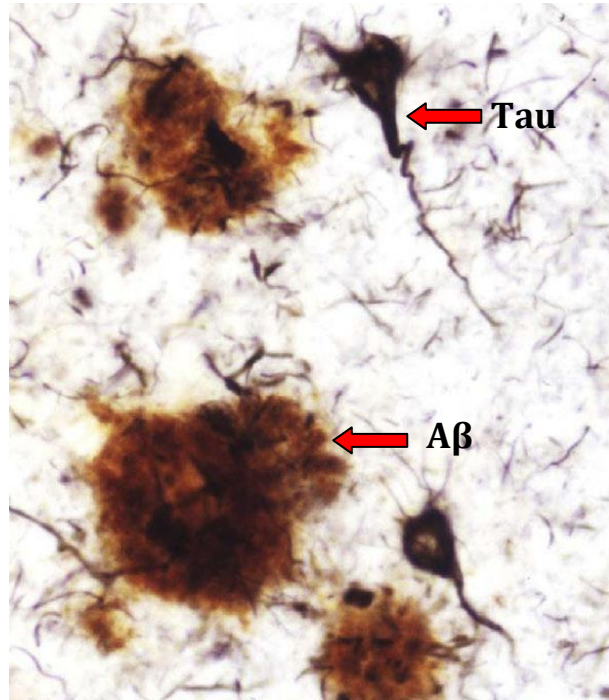


Figura 1: Histopatología de la EA. Sección de neocorteza cerebral afectado con EA. Se utilizó la técnica inmunohistoquímica de doble marca, para A β y proteína Tau asociada a microtúbulos. (Nelson y col. 2012).

En los casos típicos de la enfermedad de Alzheimer, existe un patrón de distribución temporal de las lesiones histopatológicas características. La deposición de A β precede a los cambios neuríticos, con aparente origen en los lóbulos frontal y temporal, hipocampo y sistema límbico (Figura 2).

Los ovillos neurofibrilares y la degeneración neurítica comienzan en los lóbulos temporales medianos y el hipocampo, y se propagan progresivamente a otras áreas del neocórtex (Figura 2).

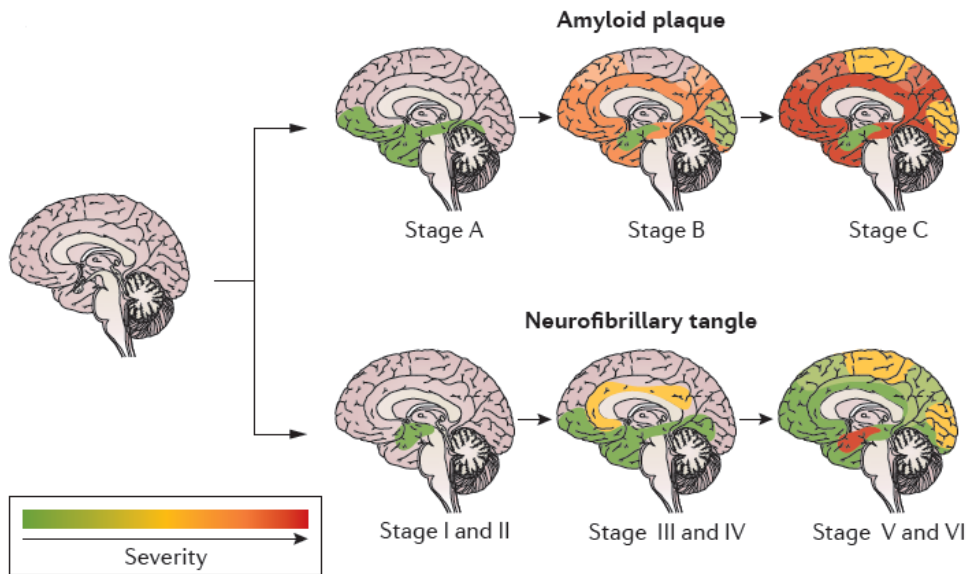


Figura 2: Evolución patológica de EA. Se observan los cambios y distribución temporal de la deposición de A β (fila superior) y ovillos neurofibrilares (fila inferior). (Masters y col. 2015).

A nivel macroscópico, se pueden observar cambios en el cerebro, como son la dilatación de los ventrículos cerebrales laterales, disminución del volumen cerebral y atrofia en estructuras como el hipocampo, lóbulo temporal medial y zonas de la neocorteza (Serrano-Pozo y col. 2011; Braak y Braak 1991).

Si bien la neurotoxicidad de A β ha sido numerosas veces demostrada tanto in vitro como in vivo, el mecanismo subyacente a tal toxicidad no ha sido claramente definido.

El péptido A β es derivado del clivaje de la proteína precursora del A β (APP), la cual es una proteína de membrana de paso simple con ciertos rasgos reminiscentes a un receptor de membrana (Bignante y col. 2013). Este procesamiento proteolítico, involucra en primer lugar el clivaje de APP por la enzima β -secretasa sobre el dominio extracelular, generando un fragmento soluble llamado sAPP β y un fragmento transmembrana denominado CTF (C-terminal fragments). En segundo lugar, actúa la enzima γ -secretasa sobre el fragmento APP β -CTF, originando así por un lado al A β , el cual es liberado al medio extracelular, y por otro a un péptido llamado AICD, el cual es intracelular (Thinakaran y Gopal 2008),

(Figura 3). También se ha identificado otra vía proteolítica para APP, la cual involucra la acción de dos enzimas, α - y γ -secretasas, pero la misma es no amiloidogénica, por lo tanto, el péptido $A\beta$ no es generado.

El $A\beta$ se produce en gran medida durante la internalización y el procesamiento endosomal de APP. La mayor parte del $A\beta$ generado dentro de las células se destina a secreción. Tanto $A\beta_{40}$ como $A\beta_{42}$ pueden detectarse en fluidos extracelulares (Herrera-Rivero y col. 2010).

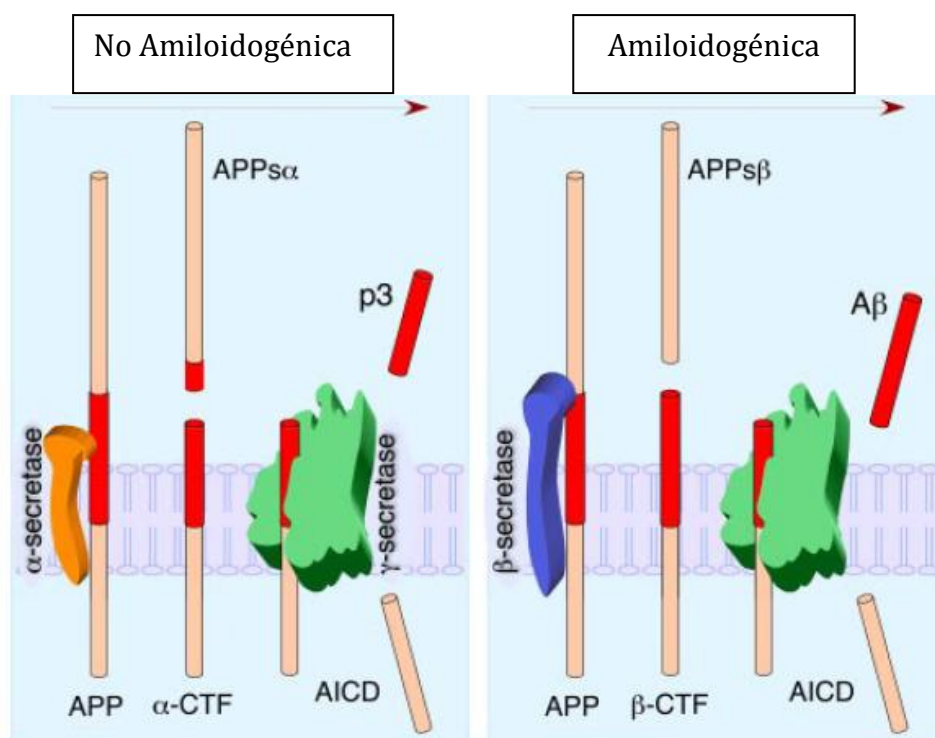


Figura 3: Esquematación del procesamiento proteolítico de APP. Se muestra la actividad de las enzimas α -, β -, γ -secretasas involucradas en la vía no amiloidogénica (izquierda) y la amiloidogénica (derecha). Esta última da origen al péptido $A\beta$. (Thinakaran y Gopal 2008).

En nuestro laboratorio trabajamos con la hipótesis general de que APP, además de ser la única fuente de $A\beta$, actúa como un receptor de sus formas agregadas, de manera tal que varios de sus efectos neurotóxicos están ligados a la interacción $A\beta$ -APP. Otros estudios también indican que APP puede funcionar como un receptor transmembrana, capaz de regular las respuestas neuronales tanto en el cerebro en

desarrollo como en el cerebro maduro. También se establecieron varios roles de los miembros de la familia de APP, como son la neuroprotección, señalización de estrés y envejecimiento (Ramaker y col 2017).

Por otro lado, previamente se había definido una función de APP en la regulación de la muerte neuronal dependiente de proteína Go (Sudo y col. 2001). En esta ocasión se sugirió que una desregulación de esta vía podría contribuir a la pérdida neuronal asociada a ciertas formas familiares de EA. Así también, en otro trabajo, se enfatizó que APP activa las vías intracelulares que causan apoptosis, lo cual involucra proteína G heterotrimérica, específicamente Go (Yamatsuji y col. 1996).

Posteriormente, nuestro grupo de trabajo demostró también que el A β agregado es capaz de activar esta vía promoviendo una reducción en la viabilidad neuronal, hallazgos de gran importancia en el marco de la enfermedad (Solá Vigo y col. 2009). Lo que es más, datos aún no publicados muestran que esta cascada de señalización promueve la ocurrencia de efectos neurotóxicos tempranos inducidos por A β , tales como pérdida de la conectividad sináptica y la distrofia neuronal (Bignante y col. en revisión). Recientemente, esta vía ha sido involucrada a eventos relacionados a la liberación fisiológica de neurotransmisores. En este caso, el A β soluble monomérico se uniría a APP, induciendo su homodimerización y activando la proteína Go y complejo $\beta\gamma$. (Fogel y col. 2014) (Figura 4). De manera tal que la vía A β - APP-Go- $\beta\gamma$ parece contribuir a una correcta neurotransmisión sináptica de los circuitos neuronales, pero un factor que desregule esta vía, como podría serlo la activación exacerbada inducida por la presencia de A β fibrilar, podría inducir a un deterioro sináptico, distrofia y apoptosis neuronal.

Se sabe que varios receptores de membrana deben dimerizar a fin de poder señalizar al interior celular y este efecto podría ser potenciado o interferido por la unión con un ligando (Terrillon y Bouvier 2004). En este sentido fue demostrado que el APP monomérico existe en equilibrio entre sus formas diméricas y tetraméricas (Scheuerman y col. 2001). Por otro lado, APP y otros miembros de su familia como APLP1 y APLP2, pueden formar homo y heterodímeros. De hecho, se han descrito consecuencias fisiológicas a tales multimerizaciones, como son las interacciones célula-célula y célula sustrato (Soba y col. 2005, Baumkötter y col. 2012).

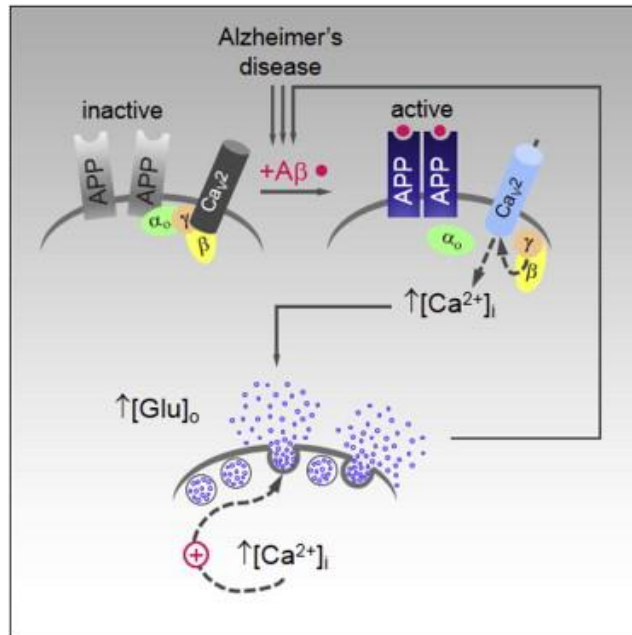


Figura 4: Cascada de señalización Aβ- APP-Go ligada a la liberación fisiológica de glutamato. Aβ actúa como ligando uniéndose a su receptor APP. Esto genera homodimerización APP-APP, lo cual activa a la proteína Go, quien señala la liberación sináptica de glutamato a través de la subunidad βγ (Fogel y col. 2014).

Además, la homodimerización de APP fue mostrado que afecta su propio procesamiento por secretasas y por ende regula la amiloidogénesis. (Kaden y col. 2008, Lefort y col. 2012, Munter y col. 2007; Scheuermann y col. 2001). Se ha reportado que la interferencia de la homodimerización de APP puede tener ciertos efectos en la célula. Por ejemplo, el producto del corte de la α-secretasa sobre APP genera un fragmento soluble (sAPPα), el cual interfiere con la homodimerización de APP en la membrana plasmática provocando un efecto neuroprotectivo contra la muerte neuronal por inanición (Gralle y col. 2009, Zhang y col. 2011). Más recientemente, se vinculó a la homodimerización de APP con la regulación de liberación de glutamato en sinapsis excitatorias (Fogel y col. 2011) (Figura 4). Todos estos antecedentes ponen en evidencia un rol de la multimerización de APP en el metabolismo y sobrevivencia neuronal.

Por otro lado se ha relacionado la homodimerización de APP con aspectos patológicos. En este sentido, se relacionó la heterodimerización de APP/C99 (fragmento que queda del corte de APP por la β-secretasa) con una aumentada vulnerabilidad de la célula a la muerte apoptótica (Lu y col. 2003, Shaked y col.

2006, Park y col. 2009). El aumento en la dimerización de APP se puede lograr por adición al medio de cultivo de un anticuerpo (22C11) que se une al dominio extracelular del APP (Lefort y col. 2012). Otros grupos han reportado que este tratamiento induce distrofia neurítica y muerte apoptótica (Xu y col. 2009, Rohn y col. 2000). Interesantemente existe alguna evidencia que muestra que el tratamiento con A β , induce un incremento en la dimerización de APP y una incrementada citotoxicidad (Lu y col. 2003, Heredia y col. 2004, Shaked y col. 2006). Lu y colegas proponen un modelo donde la toxicidad temprana de A β es mediada por la multimerización de APP, la cual recluta a caspasa 8 provocando la generación de un fragmento C31 citotóxico (Lu y col. 2003).

En nuestro laboratorio estamos interesados en determinar si el A β agregado afecta la multimerización de APP y si ello es un evento clave para la activación de la proteína Go y su cascada de señalización aguas abajo, que concluiría en neurotoxicidad.

Es por eso que el **objetivo principal de este trabajo es poner a punto una técnica confiable y reproducible para dilucidar si el tratamiento con A β fibrilar es capaz de inducir la homodimerización de APP y de esa manera explorar posibles formas de modular este evento y sus consecuencias neurotóxicas.**

Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1- Caracterizar la expresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Cherry en cultivos hipocampales primarios.

Se transfectaron cultivos hipocampales primarios con los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch. Se estudiaron distintas variables como son: edad de las neuronas, concentración de los plásmidos utilizados y el tiempo de expresión de los mismos, para establecer las condiciones en la que se logre una mayor eficiencia en la transfección.

2- Analizar a través de la técnica de FRET, el efecto de A β fibrilar sobre la homodimerización de APP.

Se utilizaron cultivos hipocampales primarios transfectados con los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch. Se comparará el grado de homodimerización de APP en cultivos tratados con vehículo o A β fibrilar a través de la técnica de FRET en su variante fotoblanqueo del aceptor.

Materiales y Métodos.

.Purificación y amplificación de plásmidos.

Los plásmidos que se utilizaron fueron gentilmente donados por la Dra. Slutsky. Se trata de dos plásmidos que expresan a la proteína APP fusionado a la proteína verde fluorescente GFP (CAMKII-APP-GFP) o a la Cherry (CAMKII-APP-Ch). Ambos utilizan como promotor el gen de la CAMKII, lo cual asegura que la expresión será restringida a neuronas glutamatérgicas. Se extrajeron los plásmidos que fueron enviados en papel y se amplificaron por clonado molecular. Para ello, se mezclaron 100 μ l de bacterias competentes XL-Blue con 1 μ l de plásmido de interés, se incubó durante 20 minutos en hielo y 35 segundos a 42°C, seguido de 2 minutos en hielo nuevamente. Se agregaron 900 μ l de LB líquido y se incubó en un agitador a 37°C durante 1 hora. Luego, se sembraron 100 μ l en placas con LB/ agar-ampicilina. Una vez que las bacterias crecieron, se picaron varias colonias y se las dejó crecer en un cultivo de 25 ml de LB con ampicilina, durante 1 día en agitación.

La purificación de ambos plásmidos, se llevó a cabo utilizando el kit de MIDI QUIAGEN, según especifica el protocolo. La concentración de los plásmidos se midió utilizando el equipo NanoDrop (ThermoScientific).

A los fines de chequear la integridad de los plásmidos purificados, se realizó una corrida electroforética de los mismos, en agarosa 0,8 %. Se corrió en paralelo una alícuota del plásmido pEGP-N3 con el inserto YFP como control. Se sembraron en cada carril, 50 ng (según cuantificación en Nanodrop) de cada muestra de ADN, mezclados con 4,5 μ l de Buffer TAE 1X y 1 μ l de una disolución del colorante

fluorescente para ADN (GelGreen, Biotium). Se realizó la corrida electroforética a 90 mV.

.Cultivos hipocampales primarios.

Se utilizaron cultivos obtenidos de embriones de ratas Wistar de 18 días de gestación, como ha sido descrito previamente en Solá Vigo y col. 2009. En breve, las ratas madres fueron sacrificadas por exposición a Dióxido de Carbono y los embriones fueron removidos de la cavidad abdominal y colocados en capsulas de Petri estériles. Luego, se disecaron los hipocampos, utilizando una lupa y empleando material quirúrgico para micro-disección. Se realizó una digestión con tripsina 0,25 % durante 15 minutos a 37 °C. Luego, las células fueron disgregadas mecánicamente mediante el empleo de pipetas Pasteur y se sembraron a alta densidad, entre 30 mil y 35 mil células/mm² en placas de 35 mm o placas multiwell de 96 pocillos, pretratados con Polilisina 1 mg/ml. Se utilizó como medio de siembra DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero de caballo (GIBCO). El mismo fue reemplazado luego de dos horas por medio de cultivo Neurobasal (GIBCO) suplementado con B27 (GIBCO) y Glutamax (GIBCO). Los cultivos fueron mantenidos en una atmosfera con 5% de Dióxido de Carbono y a una temperatura de 37°C en incubador hasta su utilización. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en estricto acuerdo con la guía del Consejo Institucional de cuidado animal (CICUAL-INIMEC) y se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales usados.

.Puesta a punto del método de transfección de los plásmidos.

Para encontrar las mejores condiciones de expresión de los plásmidos a utilizar, se utilizaron cultivos neuronales sembrados en placas de 96 pocillos pretratados con Polilisina 1mg/ml, a fin de poder comparar varias condiciones simultáneamente.

Se realizaron transfecciones con ambos plásmidos, CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch, en cultivos de 3, 7 y 14 DIV a fin de testear la edad del cultivo en la que la expresión sea más efectiva. Además, utilizamos distintas concentraciones de ADN, y se probaron distintos tiempos de expresión.

La transfección se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo el protocolo que describe el producto. Brevemente, cantidades variables de ADN, se mezclaron con 2 μ l/pocillo de Neurobasal. Para el Mix Lipofectamina se utilizó 0,6 μ l/pocillo de Lipofectamina y 8 μ l/pocillo de Neurobasal. Se mezclaron ambos y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir la formación del complejo ADN/Lipofectamina. Posteriormente se le agregó a la mezcla, 50 μ l/pocillo de Neurobasal e inmediatamente se agregan 60, 6 μ l de ésta, a cada pocillo de la placa. Se incubó durante 1 hora y media a 37°C y 5% de Dióxido de Carbono. Posteriormente, se retiró la mezcla de transfección y se restituyó el medio condicionado. Las células fueron fijadas a distintas horas post-transfección.

.Coexpresión de los plásmidos.

Una vez establecidas las condiciones necesarias para lograr la mejor eficiencia de expresión de los plásmidos, se realizaron las transfecciones en vidrios de 12 mm pre-tratados con Polilisina 1mg/ml, contenidos en placas de Petri de 35 mm. Se co-transfectaron ambos plásmidos, CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch y luego se realizó el tratamiento con vehículo o con fibras de A β 20 μ M.

Para la transfección, se utilizaron 15 μ g de ADN y 33,3 μ l de medio Neurobasal. Para el Mix de Lipofectamina se usaron 10 μ l de Lipofectamina 2000 y 133,3 μ l de medio Neurobasal. Esto se mezcló y se incubó durante 20 minutos. Luego se le agregó 900 μ l de medio Neurobasal. A cada placa se le distribuyeron 1200 μ l de la mezcla de transfección. Se lo incubó durante 1 hora y media. Finalizando, se retiró la mezcla y se agregó medio Neurobasal. Los cultivos, se trataron con vehículo o fibras de A β 20 μ M por 24 hs. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% y fueron montados sobre portaobjetos empleando el medio de montaje Fluorsave (Sigma Aldrich.). Los preparados se observaron utilizando microscopio de fluorescencia y las imágenes fueron procesadas mediante el programa FIJI.

.Tratamientos.

Para los tratamientos con el péptido A β , se utilizaron péptidos sintéticos comerciales que corresponden al fragmento 25-35 del péptido completo (Biopeptide Co, San Diego, Estados Unidos). Para preparar las fibras de A β , se pesaron 100 μ g del fragmento A β 25-35 y el mismo fue diluido en 100 μ l de agua bidestilada estéril. Esto se incubó 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 incorporada a los cultivos establecidos, a una concentración de 20 μ M.

.Técnica de FRET por fotoblanqueo del aceptor.

Para el análisis de la interacción entre APP-GFP y APP-Ch, las muestras fueron visualizadas en un microscopio invertido Olympus IX-71 equipado con un objetivo plan apocromático 60x (NA = 1.4), un set de filtros FRET estándar 488-568, y una cámara ANDOR iXon3 (DU-888E-C00-#BV). Se llevó a cabo la técnica de FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Föster). Esta técnica es útil a la hora de investigar el grado de interacción física entre dos proteínas. Brevemente, cuando dos proteínas fusionadas a un fluoróforo están interactuando, ésta cercanía física (que debe ser <100 Å) permite que al estimular al fluoróforo GFP (donor), éste emitirá energía que será absorbida por el fluoróforo Cherry (aceptor). La eficiencia de transferencia de energía FRET está directamente relacionada con la distancia de separación del donante y el aceptor. En este caso particular, realizamos la variante de la técnica en donde el fluoróforo aceptor de energía es fotoblanqueado durante 1 minuto. La eficiencia de FRET en este caso resulta de la comparación entre la intensidad de donante antes y después del blanqueo. De haber inicialmente FRET, la intensidad después del blanqueo aumentará (es decir cuando el aceptor ya no pueda absorber energía por estar blanqueado). Las imágenes fueron analizadas en el software FIJI con el cual se generaron los mapas FRET y se obtuvieron los valores de eficiencia media de FRET (Em). El análisis de FRET fue regional, se realizó mediante la utilización de ROIs (regiones de interés) pequeños establecidos en tres segmentos dentro de una misma célula: dos en los procesos y uno en el soma.

.Análisis estadístico.

Los datos fueron comparados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey. Los resultados se presentan como media \pm SEM.

Resultados.

Purificación de los plásmidos.

Se trabajó con los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch, los cuales fueron amplificados y luego purificados mediante el kit de MIDI de QUIAGEN, como se detalló anteriormente. También se llevó a cabo la determinación de la concentración en la que se encontraban ambos plásmidos, mediante el equipo NanoDrop.

Para verificar la integridad de los plásmidos purificados se llevó a cabo una corrida electroforética, que se muestra en la Figura 5. Se utilizó como control de la técnica el plásmido pEGP-N3-YFP.

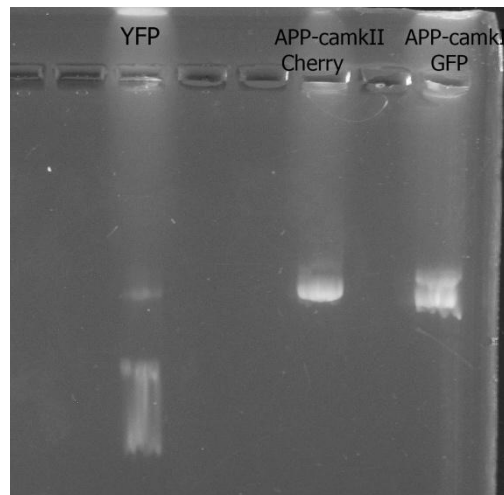


Figura 5: Corrida electroforética de los plásmidos purificados. Se observa las bandas correspondientes a los plásmidos CAMKII-APP-Ch, una banda para CAMKII-APP-GFP y una banda para YFP utilizado como control de la técnica utilizada.

Como puede observarse en la Figura 5, se obtuvieron bandas discretas para los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch, demostrando la presencia y buen estado de los mismos.

Puesta a punto del método de transfección de los plásmidos.

Para determinar las condiciones óptimas de transfección, se realizaron ensayos en Multiwells de 96 pozos, en donde se pudo variar condiciones que influyen en la técnica. De esa forma se pudo indagar utilizando poco material, en relación a tres variables: edad del cultivo, concentración de ADN y tiempo de expresión. Así, se transfectaron cultivos hipocampales primarios a los 3, 7 y 14 DIV. Se utilizaron distintas concentraciones de ADN tanto para CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch, a saber: 0,75 ng/μl; 2,5 ng/μl; 12,5 ng/μl y 25 ng/μl. También se varió el tiempo de expresión de los plásmidos, visualizándose a las 6 hs, 24 hs y 48 hs luego de realizada la misma. Los preparados fueron analizados en un microscopio de fluorescencia a 20x de magnificación (Zeiss), en donde se contaron la cantidad de neuronas viables expresando los plásmidos por cada condición. Se entiende por neuronas viables, aquellas que presentan soma y al menos un par de procesos bien definidos de una longitud de más de dos somas de largo, y se descartaron aquellas neuronas que no cumplieron con tales características o bien presentaban indicios de fragmentación o retracción.

En relación a la edad del cultivo, los resultados arrojaron que en las neuronas jóvenes (3 DIV), el plásmido YFP se expresó adecuadamente pero no se obtuvo expresión de los plásmidos con el promotor CAMKII. La expresión de éstos fue más efectiva a los 7 DIV, en donde se observaron neuronas transfectadas, tanto con CAMKII-APP-GFP como con CAMKII-APP-Ch. Estas neuronas, además, se mostraron sanas, con al menos dos procesos bien definidos, con una longitud mayor que el doble de la longitud del soma. En cuanto a las concentraciones de ADN utilizados, la mejor expresión se logró con una concentración de 12,5 ng/μl. En las concentraciones más bajas utilizadas (0,75 ng/μl y 2,5 ng/μl), la cantidad de neuronas transfectadas, disminuye considerablemente, mientras que a concentraciones mayores (25 ng/μl) encontramos muerte celular. En relación a

las horas de expresión, la mejor expresión se logró a las 24 hs después de la transfección. Aquí se contaron un mayor número de neuronas viables expresando los plásmidos. Mientras que a las 6 hs y 48 hs la expresión cae considerablemente. (Figura 6).

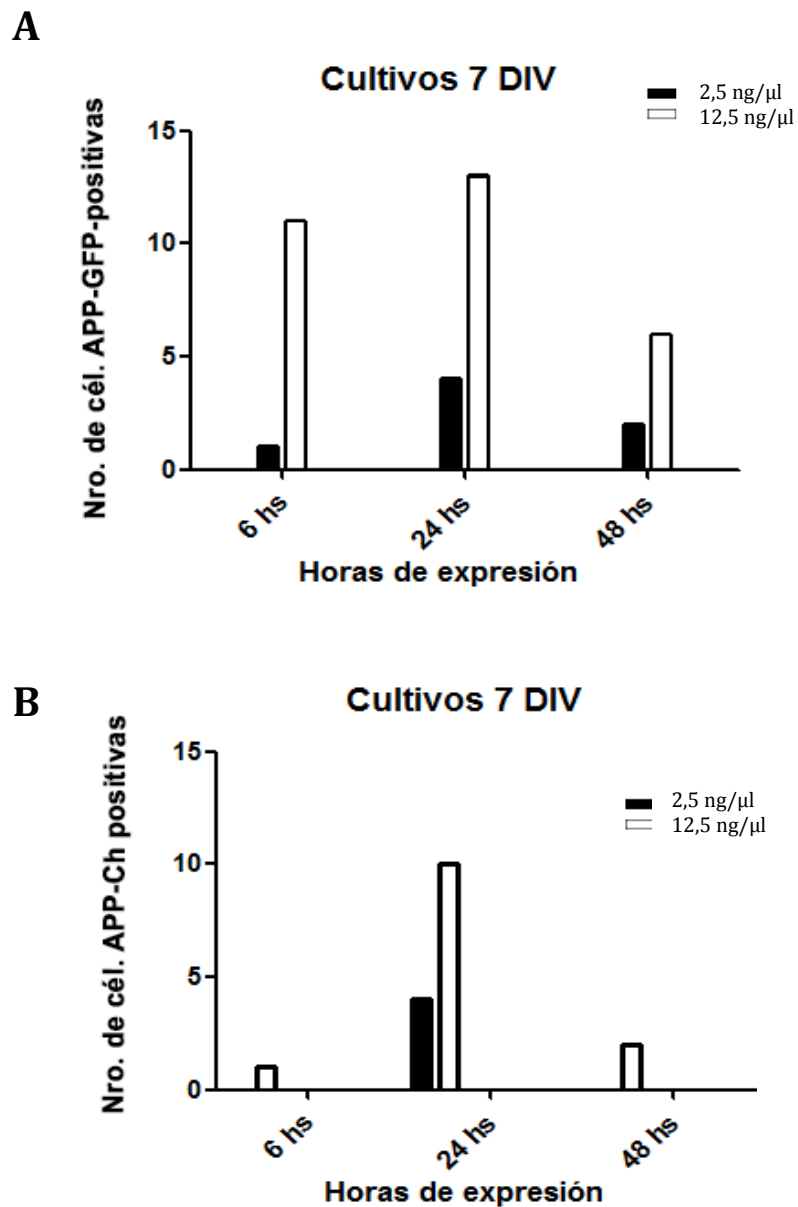


Figura 6: Cuantificación del número de neuronas viables a diferentes horas de expresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch. Cultivos 7 DIV, transfectados con dos concentraciones distintas de ADN (2,5 ng/ul y 12,5 ng/ul). **A)** Número de neuronas APP-GFP-positivas. **B)** Número de neuronas APP-Ch-positivas.

Coexpresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch.

Establecidas las condiciones en las cuales se logra mejor expresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch, los siguientes ensayos se realizaron en Placas de Petri de 35 mm, en donde los cultivos hipocampales primarios se establecieron sobre cubreobjetos. Esto nos permite realizar un análisis a una mayor magnificación.

Así, para llevar a cabo la coexpresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch, se utilizaron: cultivos hipocampales primarios de 7 DIV y una concentración de ambos ADN de 12,5 ng/ μ l. Luego las células fueron visualizadas al microscopio, 24 hs después de realizada la cotransfección, en donde las mismas fueron montadas en un portaobjetos. Las imágenes obtenidas fueron editadas con el programa FIJI (Figura 7).

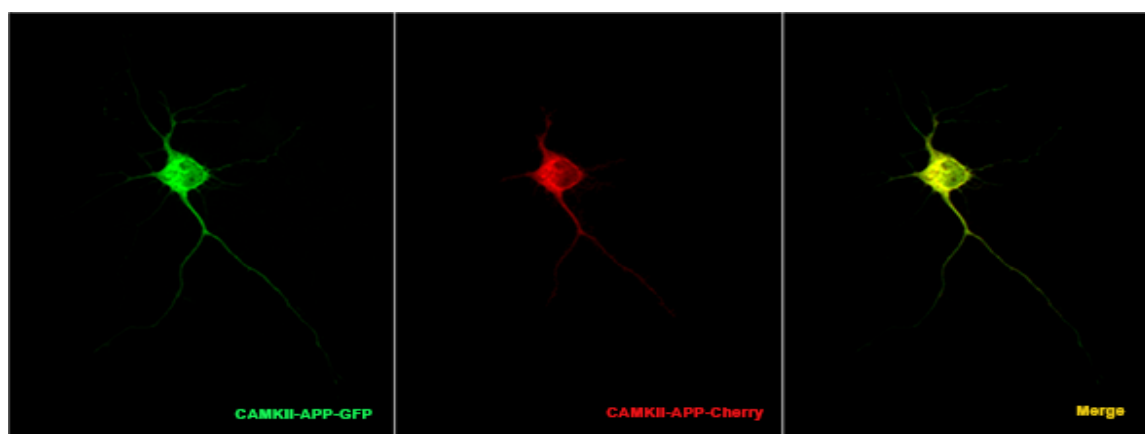


Figura 7. Coexpresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch. Cultivos hipocampales primarios de 7 DIV, transfectados con 12,5 ng/ μ l de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch.

Como podemos ver en la Figura 7, una misma neurona, transfectada con ambos plásmidos (CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch), vistas en un microscopio de fluorescencia utilizando distintos filtros, uno para poder visualizar a la proteína verde fluorescente GFP y otro que permite ver la proteína fluorescente Cherry. Por último, se realizó una superposición de las dos imágenes mediante el programa

Fiji, con el fin de obtener una imagen combinada, en la cual se puede apreciar una alta colocalización de ambas proteínas. Este resultado, nos permitió continuar nuestro análisis indagando en el grado de homodimerización de APP, utilizando FRET.

Efecto del A β en la Homodimerización APP-APP.

Para determinar el grado de interacción física entre las proteínas APP-GFP y APP-Cherry y cómo A β afecta esta interacción, se procedió a realizar la técnica FRET. Así, se realizó el montaje de los cultivos hipocampales primarios, cotransfectados y tratados con vehículo o fibras de A β 20 uM por 24 hs. Para ello, se utilizaron neuronas de 7 DIV sembradas en vidrios, cotransfectadas con CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch según las condiciones previamente establecidas. Posteriormente los cultivos fueron tratados con vehículo o fibras de A β 20 uM por 24 hs y finalmente fijados. Este experimento fue replicado tres veces, obteniendo así tres resultados independientes de distintos cultivos.

Los preparados fueron visualizados en un microscopio de fluorescencia, en el cual se llevó a cabo la técnica FRET. Se realizó la variante de la técnica en donde el fluoróforo aceptor de energía es fotoblanqueado durante 1 minuto, estableciendo como donador a GFP y aceptor Cherry. Se tomaron imágenes del donador para comparar la intensidad de fluorescencia antes y después del fotoblanqueo; las mismas fueron procesadas mediante el software Fiji, arrojando así los datos que corresponden a la eficiencia media de FRET (E_m) y también los respectivos mapas de FRET (Figura 8).

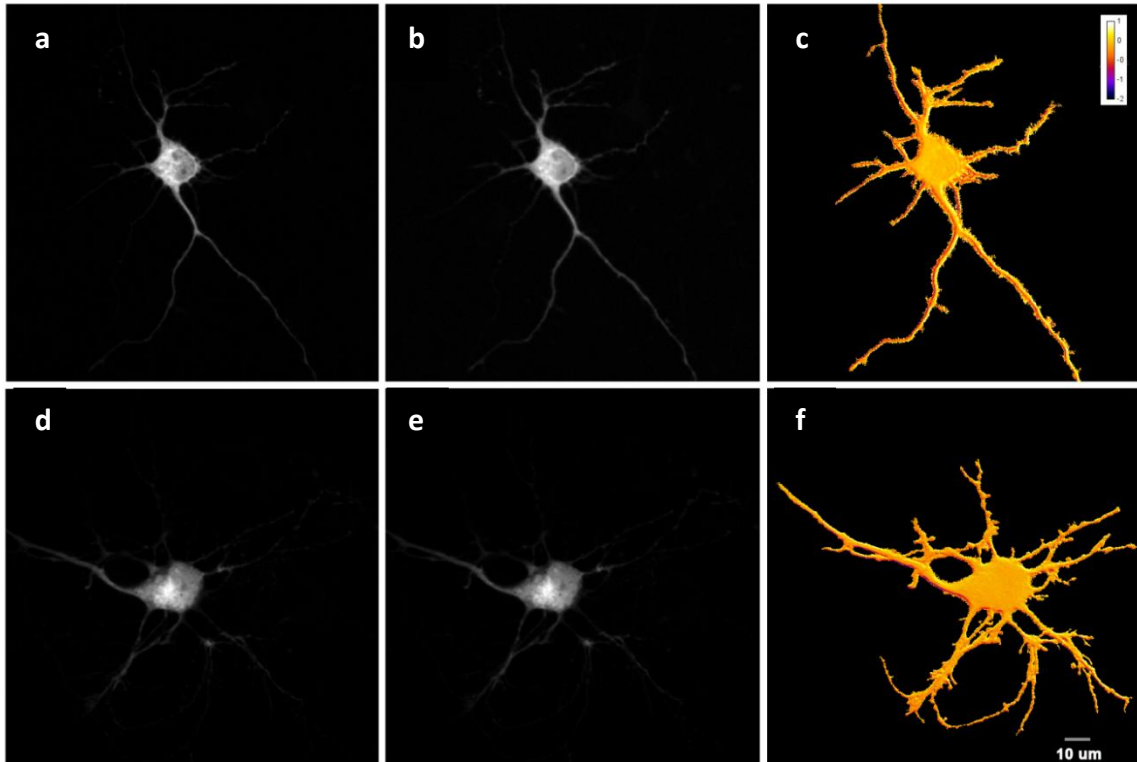
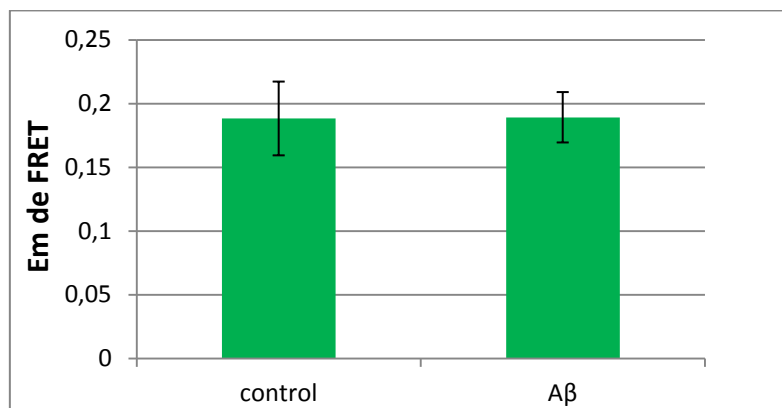
A**B**

Figura 8: Efecto del Aβ en la Em de FRET APP-APP. A) Cultivos hipocámpales primarios de 7 DIV cotransfectados con CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Cherry, y tratados con vehículo (**a, b y c**) o fibras de Aβ (**d, e y f**). Se realizó FRET por fotoblanqueo del aceptor (APP-Cherry). Se midió la intensidad de fluorescencia del donador APP-GFP, antes (**a y d**) y después del fotoblanqueo (**b y e**). Se obtuvieron los mapas que muestran la eficiencia media de FRET (Em) (**c y f**). **B)** Gráfico representando la Em en los cultivos controles y tratados con Aβ. Las barras indican el promedio de Em±SEM.

Pudimos observar que existe FRET en los cultivos hipocampales primarios tratados con vehículo indicando interacción física entre las proteínas APP-GFP y APP-Cherry ($0,188 \pm 0,029$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la eficiencia media de FRET (E_m), entre el grupo tratado con vehículo y el tratado con $A\beta$ 20 μ M ($0,189 \pm 0,020$) ANOVA de una vía ($F(1,64)=0,00072$; $p=0,97870$)(Figura 7 y 8).

Discusión y Conclusión.

De acuerdo con los resultados obtenidos, logramos caracterizar la expresión de los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Cherry y poner a punto la técnica de transfección en cultivos hipocampales primarios. Los vectores utilizados, poseen el promotor CAMKII (proteína quinasa dependiente de Calcio/ Calmodulina II) lo cual tiene varias ventajas con respecto a otros plásmidos disponibles para expresar APP que poseen promotor CMV (Citomegalovirus). Por un lado, son específicos de neuronas y por otro lado es un promotor con menos potencia lo cual resulta menos agresivo y tóxico para las células. Sin embargo, la cinética de expresión es distinta, lo que nos llevó a realizar un análisis temporal, con el cual determinamos que el tiempo de expresión adecuado con el que logramos mayor número de células transfectadas es de 24 hs. Con este resultado surge otra diferencia con respecto a la expresión regida por CMV, en cuyo caso a las 24 hs se observaba una reducción de la viabilidad debida a la sobreexpresión *per se* de APP.

Trabajos realizados, reportan que las transfecciones de cultivos hipocampales primarios con Lipofectamina consiguen una eficiencia no mayor al 5% en cultivos de 2-3 DIV (Sola Vigo y col., 2009), y son muchos menores en cultivos de 7 DIV o más. En este caso, obtuvimos un patrón de eficiencia inverso, encontrando mejor expresión de los plásmidos a los 7 que a los 3 DIV. Especulamos que esto se debe a que se requiere cierta madurez de la neurona para que exprese suficiente CAMKII que es quien regula la expresión del plásmido en este caso.

Se reportó en numerosos estudios que APP puede existir como dímeros u multímeros (Rossjohn y col. 1999, Scheuermann y col. 2001, Wang y Ha 2004, Chen y col. 2006). Algunos trabajos, le asignan cierto rol funcional a la multimerización de APP, por ej se lo ha relacionado con la regulación de la amiloidogénesis (Scheuermann y col. 2001; Munter y col. 2007, Lefort y col. 2012). Recientemente ha sido planteado que el A β monomérico o dimérico es capaz de inducir la dimerización de APP, activar a la proteína Go, señalizar vía el complejo $\beta\gamma$ y mediar la liberación de neurotransmisores en neuronas excitatorias. Esto definiría un nuevo mecanismo fisiológico atribuible al A β no agregado que implica la homodimerización de APP (Fogel y col. 2014).

Por otro lado, basados en cierta evidencia, en este trabajo planteamos la hipótesis de que los agregados de A β (fibras) interactúan con el APP transmembrana, produciendo así un aumento de su homodimerización. En este caso, la presencia sostenida de las fibras amiloides llevaría a que la señalización intracelular se mantenga en el tiempo como consecuencia de la homodimerización no transiente de APP y activación de Go, lo que provocaría efectos neurotóxicos ligados a la patología. Muchos de estos aspectos han sido experimentalmente probados y reportados por nuestro grupo de trabajo: la unión de fibras de A β al dominio extracelular de APP, la consecuente activación de la proteína Go y del complejo $\beta\gamma$ mediando neurodegeneración (Solá Vigo y col. 2009, Kedikian y col. 2010, Bignante y col. en revisión). De allí que el objetivo de este trabajo es conectar todos estos eventos al fenómeno de homodimerización sostenida de APP inducida por fibras de A β .

Evaluamos el grado de interacción entre moléculas de APP utilizando la técnica de FRET. Fogel y col. habían determinado, utilizando una variante de esta técnica, que las interacciones APP-APP ocurren fisiológicamente a niveles relevantes. Nosotros confirmamos esto en nuestro modelo experimental. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas de Em de FRET entre los cultivos control y aquellos tratados con fibras de A β . Frente a este resultado, el primer aspecto que decidimos modificar, fue realizar un análisis regional más específico. Para ello se establecieron ROIs en secciones pequeñas discriminando entre los procesos y el

soma. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos, por lo cual los resultados que se muestran los incluyen a ambos.

Un aspecto que puede sustentar este resultado, y que por razones de tiempo no pudimos explorar, es que a las 24 hs la expresión de los plásmidos sea tan elevada que exista una multimerización artefactual, basalmente alta. Este efecto “techo” en la expresión, nos imposibilitaría poner en evidencia la modulación por A β . Para indagar sobre este aspecto se debería realizar el análisis a tiempos de expresión más cortos (entre 12 y 16 hs).

Por último, es necesario incluir controles positivos y negativos en los ensayos. A modo de ejemplo, un control negativo podría ser realizar la técnica FRET entre APP y otro receptor de membrana diferente a APP, en cuyo caso no deberíamos encontrar interacción entre estas proteínas, por lo tanto el FRET sería cero. Como control positivo se podría realizar FRET de los APP fusionados, tratados con el anticuerpo 22C11. Este anticuerpo se une a la porción N-terminal del APP e induce su dimerización (Fogel y col. 2014).

A diferencia de lo encontrado en el presente trabajo, Fogel y col. reportan que el A β soluble es capaz de aumentar el grado de FRET de APP. Sin embargo hay varios aspectos en los cuales puede radicar esta diferencia. Por ejemplo, en tal trabajo se llevó a cabo un análisis de FRET, mucho más regionalizado en donde se establecieron ROIs en zonas sinápticas a gran magnificación. En nuestro estudio, si bien se discriminó entre soma y procesos, los ROIs fueron determinados al azar, y no distinguieron zonas sinápticas. Esto podría explicar las diferencias en los resultados de ambos estudios.

Por otro lado, Scheuermann y col. proponen que APP ya se encuentra dimerizado desde su paso por el aparato de Golgi y se ancla en la membrana plasmática como dímero, lo cual podría ser una razón por la que en nuestro trabajo no vemos diferencias entre aquellos cultivos tratados con vehículo (control) y aquellos con A β .

Para concluir, podemos afirmar que a través de este trabajo de tesina logramos encontrar las condiciones óptimas para expresar adecuadamente los plásmidos CAMKII-APP-GFP y CAMKII-APP-Ch en cultivos hipocampales primarios. Además, logramos poner a punto la técnica de FRET por fotoblanqueo del aceptor en cultivos neuronales expresando dichos plásmidos. Finalmente, encontramos que hay un grado de FRET basal de APP, el cual no pudo ser modulado con el tratamiento con A β en las presentes condiciones experimentales, sugiriendo que el APP exógeno se expresa basalmente dimerizado desde la vía secretoria; o bien, que el evento de dimerización no es modulable mediante el tratamiento con A β agregado.

Bibliografia.

- .ALZHEIMER'S ASSOCIATION. (2014). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 10: e47-e92.
- .Baumkötter F, Wagner K, Eggert S, Wild K, Kins S. (2012). Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Exp Brain Res* 217: 389-395.
- .Bignante EA, Heredia F, Morfini G, Lorenzo A. (2013) Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β --induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34: 2525-37.
- .Braak H, Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82: 239-259.
- .Chen C. D, Oh S. Y, Hinman J. D, Abraham C. R. (2006). Visualization of APP dimerization and APP-Notch2 heterodimerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *J. Neurochem.* 97: 30-43.
- .Fogel H, Frere S, Segev O, Bharill S, Shapira I, Gazit N, O'Malley T, Slomowitz E, Berdichevsky Y, Walsh DM, Isacoff EY, Hirsch JA, Slutsky I. (2014). APP homodimers transduce an amyloid- β -mediated increase in release probability at excitatory synapses. *Cell Rep.* 7: 1560-76.
- .Gralle M, Botelho MG, Wouters FS. (2009). Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J Biol Chem.* 284: 15016-15025.
- .Hardy J, Selkoe DJ. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-6.
- .Heredia L, Lin R, Vigo F S, Kedikian G, Busciglio J, Lorenzo A. (2004). Deposition of amyloid fibrils promotes cell-surface accumulation of amyloid beta precursor protein. *Neurobiol Dis.* 16: 617-29.

- .Herrera-Rivero M, Hernandez-Aguilar M. E, Manzo, J, Aranda-Abreu G. E. (2010). Alzheimer's disease: immunity and diagnosis. *Revista de neurologia* 51: 153-164.
- .Iqbal K, Gong Cheng X, Liu Fei. (2014). Microtubule-associated protein tau as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Expert opinion on therapeutic targets* 18: 307-318.
- .Kaden D, Munter LM, Joshi M, Treiber C, Weise C, Bethge T, Voigt P, Schaefer M, Beyermann M, Reif B, Multhaup G. (2008). Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *J Biol Chem.* 283:7271-7279.
- .Karran E, Mercken M, Strooper B. D. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 10:698-712.
- .Lefort R, Pozueta J, Shelanski M. (2012). Cross-linking of cell surface Amyloid Precursor protein leads to increased β -Amyloid peptide production in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32: 10674–10685.
- .Lu DC, Shaked GM, Masliah E, Bredesen DE, and Koo EH. (2003). Amyloid β protein toxicity mediated by the formation of Amyloid- β protein precursor complexes. *Ann. Neurol.*54: 781-789.
- .Masters C. L, Bateman R, Blennow K, Rowe C. C, Sperling R. A, Cummings J. L. (2015). Alzheimer's disease 1, 15056.
- .Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, Pipkorn R, Schaefer M, Langosch D, Multhaup G. (2007). GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J.* 26:1702-1712.
- .Nelson P T, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, ... y Duyckaerts C. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive

status: a review of the literature. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 71:362-381.

.Park SA, Shaked GM, Bredesen DE, Koo EH. (2009). Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 388:450-455.

.Ramaker JM, Copenhaver PF. (2017). Amyloid Precursor Protein family as unconventional G_o-coupled receptors and the control of neuronal motility. *Neurogenesis* 4: e1288510.

.Rohn TT, Ivins KJ, Bahr BA, Cotman CW, Cribbs DH. (2000). A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis. *J. Neurochem*. 74:2331–2342.

.Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinstry WJ, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL. et al. (1999). Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol*. 6:327-331.

.Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Beher D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G. (2001). Homodimerization of Amyloid Precursor Protein and its Implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.

.Serrano-Pozo A, Frosch M. P, Masliah E, Hyman BT. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1: a006189.

.Shaked GM, Kummer MP, Lu DC, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH. (2006). Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB J*. 20:1254-1256.

.Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Müller U, Kins S, Beyreuther K. (2005). Homo- and

heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. EMBO J 24:3624-3634.

.Sola V F, Kedikian G, Heredia L, Heredia F, Dáz A A, Rosa AL, Lorenzo A. (2009). Amyloid- β precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid β through Go protein activation. *Neurobiology of aging*, 30: 1379-1392.

.Sudo H, Hashimoto Y, Niikura T, Shao Z, Yasukawa T, Ito Y, Yamada M, Hata M, Hiraki T, Kawasumi M, Kouyama K, Nishimoto I. (2001). Secreted Abeta does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 548-556.

.Thinakaran G, Koo EH. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry* 283: 29615-29619.

.Terrillon S, Bouvier M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5: 30-4.

.Wang Y and Ha Y. (2004). The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol. Cell* 15: 343-353.

.Xu YX, Wang HQ, Yan J, Sun XB, Guo JC, Zhu CQ. (2009). Antibody binding to cell surface amyloid precursor protein induces neuronal injury by deregulating the phosphorylation of local adhesion signaling related proteins. *Neuroscience Lett* 30: 1379-92.

.Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Tanaka N, Nishimoto I. (1996). Expression of V642 APP mutant causes cellular apoptosis as Alzheimer trait-linked phenotype. *The EMBO journal* 15. 498.

.Zhang Y. W, Thompson R, Zhang H, Xu H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain* 4:3.