



Papel regulador de la proteína priónica celular en la enfermedad de Alzheimer y uso de gamma-péptidos como potenciales agentes terapéuticos

Cristina Vergara Paños

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA DE CATALUÑA
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**PAPEL REGULADOR DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y USO DE GAMMA-PÉPTIDOS COMO
POTENCIALES AGENTES TERAPÉUTICOS**

Memoria presentada por la licenciada en Biotecnología

CRISTINA VERGARA PAÑOS

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita en el programa de doctorado en Biomedicina de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente tesis han sido realizados bajo la dirección del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona, y bajo la codirección de la Dra. Rosalina Gavín Marín, agregada interina del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona.

Barcelona, 2015.

Director i tutor de la tesis
Dr. José Antonio del Río
Fernández

La doctoranda
Cristina Vergara Paños

Codirector de la tesis
Dr. Rosalina Gavín Marín

“Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth.”

Jules Verne, *A Journey to the Center of the Earth*

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	V
LISTA DE FIGURAS	IX
Prólogo	1
INTRODUCCIÓN	5
1. La enfermedad de Alzheimer	5
1.1 Generalidades	5
1.1.1 El Alzheimer en la actualidad. Epidemiología.	5
1.1.2 Historia. Primeros casos.	5
1.1.3 Descripción, clínica y sintomatología.	7
1.1.4 Aspectos diagnósticos.	8
1.1.5 Etiología de la enfermedad. Factores de riesgo.	9
1.2 Bases moleculares de la enfermedad	12
1.2.1 Proteína precursora amiloide (APP)	12
1.2.2 Procesamiento de APP. Implicación en la enfermedad	15
1.2.3 Tau	17
1.3 Neuropatología/alteraciones neuropatológicas	20
1.3.1 Placas amiloides y la hipótesis de la cascada amiloide	20
1.3.2 Ovillos neurofibrilares y la agregación de tau	22
1.4 Tratamientos	24
1.4.1 Farmacológicos	24
1.4.2 Alternativos: el uso de anticuerpos y péptidos	25
1.5 Modelos experimentales de la EA	30
1.5.1 In vitro: Toxicidad del β -amiloide en cultivo neuronal	30
1.5.2 In vivo: Modelos animales.	32
1.5.3 El modelo APP/PS1 en detalle	36
2. La proteína priónica celular	39
2.1 Características generales	39
2.1.1 Estructura molecular y patrón de expresión	39
2.1.2 Funciones fisiológicas	44
2.2 Prionopatías	48
2.2.1 El prión como agente infeccioso	48
2.2.2 Enfermedades priónicas en humanos	52
2.3 PrP ^C y EA	53
2.3.1 PrP ^{Sc} y EA	53
2.3.2 PrP ^C y EA	55

3. Péptidos con capacidad de penetrar la membrana celular	58
3.1 Descripción general	58
3.1.1 Clasificación	59
3.1.2 Ventajas e inconvenientes	59
3.2 Librerías de compuestos singulares: γ -péptidos derivados de prolina	60
3.2.1 Descripción	60
3.2.2 Aplicaciones	61
 OBJETIVOS	 65
 RESULTADOS	 69
Capítulo 1	71
<i>Cellular prion protein modulates β-amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice</i>	
Capítulo 2	85
<i>Role of PrP^C Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution</i>	
Capítulo 3	105
<i>Molecular screening of a Cell-Penetrating cis- γ-Amino-L-Proline-Derived Peptides library as inhibitors of Aβ production</i>	
 DISCUSIÓN	 131
1. PrP ^C y la fosforilación y expresión de tau	133
2. PrP ^C y la acumulación de A β	141
3. Papel de A β en la capacidad infectiva del prion	145
4. Expresión de PrP ^C en diferentes estadios de la EA y en el modelo APP/PS1	147
5. Papel de PrP ^C en la transmisión sináptica	150
6. PrP ^C en la EA y en otras enfermedades neurodegenerativas	151
7. Factores que influyen en el estudio de la enfermedad de Alzheimer	152
8. Caracterización de un γ -péptido derivado de prolina como potencial agente terapéutico	155
9. Próximos pasos en el estudio de PrP ^C y la EA	158
 CONCLUSIONES	 165
 BIBLIOGRAFÍA	 169
 ANEXO I	 201
 ANNEXO II	 205

ABREVIATURAS

ACh	acetilcolina
ADAM	del inglés <i>a desintegrin and metalloprotease</i>
ADDLs	del inglés <i>Amyloid-Derived Diffusible Ligands</i>
AICD	del inglés <i>amyloid precursor protein intracelular domain</i>
Akt	proteína cinasa B o PKB
APH-1	del inglés <i>anterior pharynx defective 1</i>
APLP2 y APLP1	del inglés <i>amyloid precursor-like protein</i>
ApoE	apolipoproteína E
APP	proteína precursora amiloide
Aβ	péptido beta amiloide
BACE1	del inglés <i>beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>
BHE	barrera hematoencefálica (o BBB, del inglés <i>blood brain barrier</i>)
CA1	del inglés <i>cornu ammonis 1</i>
CAA	angiopatía amiloide cerebral
CC	región rica en residuos cargados positivamente, del inglés <i>charged cluster</i>
CD	dominio central, del inglés <i>central domain</i>
Cdk5	cinasa dependiente de ciclina 5
ChAT	acetiltransferasa
CPPs	péptidos capaces de penetrar la membrana celular, del inglés <i>cell penetrating peptides</i>
CTF	del inglés <i>COOH-terminal fragment</i>
DCL	deterioro cognitivo leve (o MCI del inglés <i>Mild cognitive impairment</i>)
DFT	demencia frontotemporal (o FTD del inglés <i>frontotemporal dementia</i>)
EA	Enfermedad de Alzheimer (o AD del inglés <i>Alzheimer's disease</i>)
ECJ	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (o CJD, del inglés <i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>)
EEB	encefalopatía espongiiforme bovina (o BSE, del inglés <i>bovine spongiform encephalopathy</i>)
eECJ	forma esporádica de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
EETs	encefalopatías espongiiformes transmisibles (o TSEs, del inglés <i>transmissible spongiform encephalopathies</i>)
EGFP	proteína verde fluorescente
EP	enfermedad de Parkinson
ERK	cinasa reguladas extracelularmente, del inglés <i>extracellular-regulated kinases</i>
FCE	factor de crecimiento epidérmico (o EGF, del inglés <i>epidermal growth factor</i>)
fECJ	forma familiar de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
FTDP-17	demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17
GFAP	del inglés <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GPI	glicosil fosfatidil inositol
GSK3	glucógeno sintasa cinasa 3
GSS	síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
hAPP	APP humana
HD	región hidrofóbica, del inglés <i>hydrophobic domain</i>
htau	tau humana
iECJ	forma iatrogénica de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
IFF	insomnio familiar fatal (o FFI, del inglés <i>fatal familial insomnia</i>)
IRES	del inglés <i>internal ribosome entry site</i>
KI	del inglés <i>knock in</i>

KO	del inglés <i>knockout</i>
LCR	líquido cefalorraquídeo
LRP1	receptor de la lipoproteína de baja densidad, del inglés <i>low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LTD	del inglés <i>long term depresión</i>
LTP	potenciación a largo plazo, del inglés <i>long term potentiation</i>
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno, del inglés <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPT	del inglés <i>microtubule asociated protein tau</i>
MARK	cinasa reguladora de la afinidad por los microtúbulos
N-CAM	molécula de adhesión neuronal, del inglés <i>neural cell adhesion molecule</i>
neo	casete de expresión de la fosfotransferasa de neomicina
NFT	ovillos neurofibrilares, del inglés <i>neurofibrillary tangles</i>
NGC	neuronas granulares del cerebelo (o CGN del inglés <i>cerebelar granule neurons</i>)
NINCDS-ADRDA	del inglés <i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and the Alzheimer`s Disease and Related Disorders Association</i>)
NMDA	del inglés <i>N-methyl-D-aspartate</i>
NMDARs	receptores de NMDA
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	del inglés <i>octarepeat region</i>
ORF	pauta de lectura, del inglés <i>open Reading frame</i>
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF-β	factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés <i>platelet derived growth factor-β</i>
PEN-2	del inglés <i>presenilin enhancer 2</i>
PHF	filamentos pareados helicoidales, del inglés <i>paired helical filaments</i>
PI3K	fosfoinositol 3 cinasa
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PP2A	fosfatasa 2 A
PrP^C	proteína priónica celular
PrP^{Sc}	proteína priónica <i>scrapie</i>
PSD-95	del inglés <i>postsynaptic density-95</i>
PSEN	presenilina
RE	retículo endoplasmático
RMN	resonancia magnética nuclear
ROS	especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxygen species</i>
SD	síndrome de down
SIRPα	proteína alfa reguladora de señal, del inglés <i>signal regulatory protein alpha</i>
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SOD-1	actividad superóxido dismutasa-1
STI-1	proteína inducible por estrés, del inglés <i>stress-inducible protein 1</i>
Tat	transactivador de la transcripción génica
vECJ	variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
WT	del inglés <i>wild type</i>

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Prevalencia de los diferentes tipos de demencias en España	5
Figura 2. Alois Alzheimer y sus dibujos	6
Figura 3. Procesamiento de APP y mutaciones mayoritarias en el gen <i>APP</i> .	11
Figura 4. Estructura de la proteína APP.	13
Figura 5. Funciones biológicas de los fragmentos de la proteína APP.	14
Figura 6. Proteólisis de la proteína APP por las vías amiloidogénica y no amiloidogénica.	16
Figura 7. Isoformas de tau.	18
Figura 8. Sitios de fosforilación de tau.	19
Figura 9. Morfología de un cerebro sano y de un cerebro de un paciente de Alzheimer.	20
Figura 10. Estructura de los oligómeros y fibras del péptido A β obtenida por ME.	21
Figura 10. Modelo agregación de los oligómeros de A β	21
Figura 11. Placas amiloides características de la enfermedad de Alzheimer.	21
Figura 12. Ovillos neurofibrilares.	22
Figura 13. Estadios definidos por Braak y Braak, 1991.	23
Figura 14. Estructura de la proteína PrP ^C .	40
Figura 15. Procesamiento de la proteína PrP ^C .	42
Figura 16. Diferencias estructurales entre PrP ^C y PrP ^{Sc} .	52
Figura 17. Modelo de señalización propuesto por Lauren. S et al.	56
Figura 18. Estructura general de los γ -péptidos derivados de prolina.	62

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Figura 19. Posibles moléculas receptoras que podrían unirse a PrP ^C	136
Figura 20. Niveles de tau y PrP ^C en animales con diferentes dosis génicas de PrP ^C .	137
Figura 21. Posibles receptores alternativos de A β .	160

Prólogo

Esta tesis se inició a finales del año 2010, concretamente en octubre, en el Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC). Forma parte de una línea de investigación llevada a cabo por el Prof. José Antonio del Río y la Dra. Rosalina Gavín, enfocada en conocer el papel de la proteína priónica celular (PrP^C) en la enfermedad de Alzheimer (EA). Esta línea ha permitido establecer colaboraciones con otros laboratorios, para poder abarcar el estudio de las dos proteínas que presentan agregados en el cerebro, el péptido beta-amiloide y tau.

Este trabajo está estructurado en torno a dos publicaciones derivadas de la investigación realizada durante los últimos 4 años, junto con un trabajo en preparación, aún no publicado. La introducción de este trabajo aporta datos actuales acerca de la enfermedad, los tratamientos disponibles hoy en día y los que están en fases clínicas, así como los modelos animales disponibles para su estudio. También se ha descrito la participación de PrP^C, tanto a nivel fisiológico, como patológico en las enfermedades priónicas, y su relación, recientemente establecida, con la EA. Por último, también se dan a conocer los γ -péptidos derivados de prolina, una nueva clase de foldámeros con propiedades interesantes para su uso terapéutico en el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas. Los resultados se resumen y se discuten de forma conjunta para aportar más datos acerca del papel de PrP^C en la EA, y el uso terapéutico de los γ -péptidos.

INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad de Alzheimer

1.1 Generalidades

1.1.1 El Alzheimer en la actualidad. Epidemiología.

Datos recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran de manera alarmante la elevada prevalencia de la demencia en el mundo (figura 1). En 2011, la cantidad de afectados ascendía a aproximadamente 35.6 millones de personas y se estima que esta cifra irá en aumento puesto que se detectan unos 7,7 millones de nuevos casos cada año. Estos datos también están relacionados con el incremento del número de personas mayores de 60 años en las poblaciones desarrolladas, que implica un aumento rápido del envejecimiento general de la población.

La enfermedad de Alzheimer (EA; o AD del inglés *Alzheimer's disease*) es la causa más común de demencia, correspondiéndose con el 60-70% de los casos actuales. En España, entre 500.000 y 800.000 personas la sufren, según datos del 2013 (PwC, 2013).

Por otro lado, es una enfermedad asociada a un elevado coste económico para la sociedad. Datos de la *Alzheimer's Association* indican que en 2014, 1 de cada 5 dólares invertidos en salud, se destina a los enfermos de Alzheimer u otras demencias, y el coste por paciente está alrededor de unos 30.000 euros anuales. Se espera que en 2050 este impacto económico sea mayor debido al aumento de nuevos casos cada año, volviéndose una situación cada vez más insostenible tanto a nivel socioeconómico como a nivel sanitario (Gaugler et al., 2014).

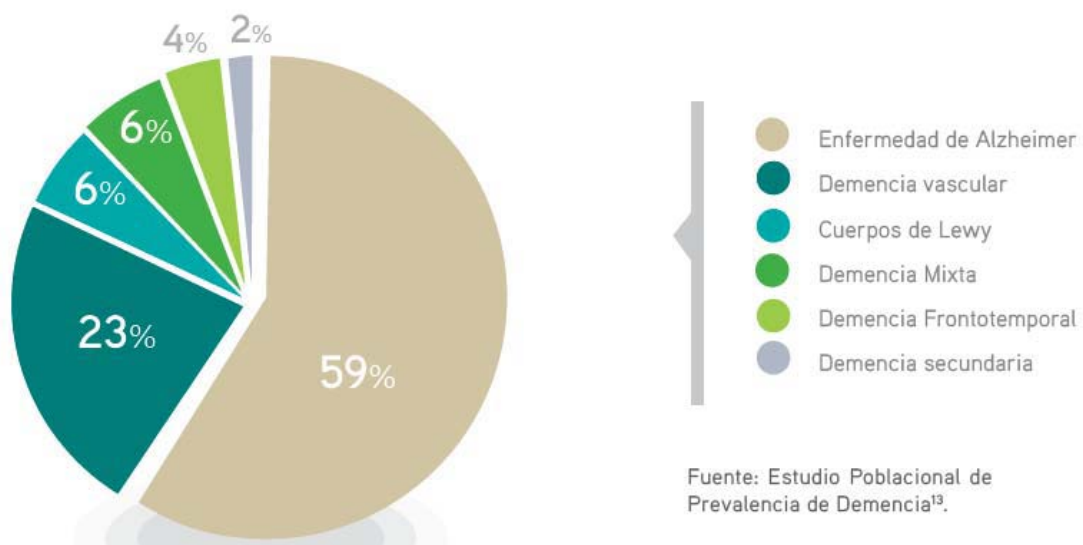


Figura 1. Prevalencia de los diferentes tipos de demencias en España. Como vemos en la imagen, la demencia más común es la enfermedad de Alzheimer. Tomado de “El estado del arte de la enfermedad de Alzheimer en España”, 2013.

1.1.2 Historia. Primeros casos.

La EA fue descrita y presentada hace más de cien años, en 1906, por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer (1864-1915), después de encontrarse con una paciente llamada Auguste Deter. Esta paciente de 51 años ingresó en la institución para enfermos mentales de Frankfurt, donde trabajaba Alzheimer, en noviembre del año 1901, debido a la insostenible situación familiar que se estaba viviendo en su casa. Empezó a fallarle su memoria, descuidaba sus tareas domésticas, pero la situación empeoró cuando también cambió su personalidad. Al principio esos cambios eran

leves pero se fueron agravando hasta el punto de desarrollar miedo ante personas conocidas e incluso pensaba que alguien quería matarla.

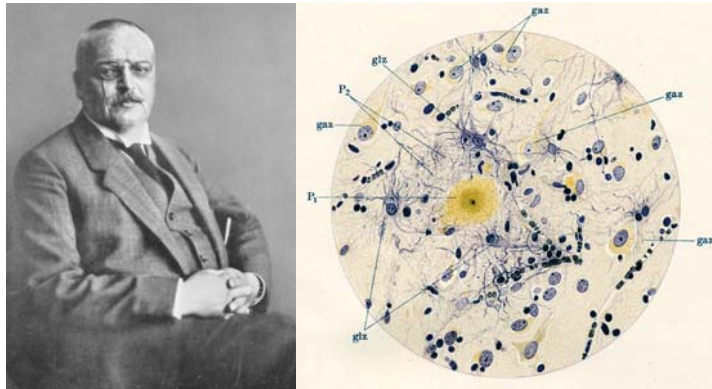


Figura 2. A la izquierda Alois Alzheimer. Tomado de Hippus H., 2003. A la derecha dibujos hechos por A. Alzheimer de las alteraciones del cerebro de Auguste Deter, donde se ven los ovillos y las placas. Tomado de Dahm R., 2006.

Las notas tomadas por Alzheimer el día que la conoció denotan la confusión que sufría la paciente y los problemas para recordar situaciones recientes. La paciente era capaz de hablar pero tenía serias dificultades para comunicarse. En pocos años, Auguste Deter dejó de hablar y de comer hasta el punto de tener que alimentarla a la fuerza en varias ocasiones. Finalmente, en 1906, la paciente contrajo una pulmonía y murió. Aunque Alzheimer ya había encontrado pacientes con síntomas similares a lo largo de su carrera, siempre habían sido de mayor edad.

Este caso, relatado a conciencia en las notas de Alzheimer, describe con precisión los cambios conductuales progresivos que se pueden ver en un paciente con esta enfermedad, pero también la confusión y desorientación, así como la incapacidad para recordar situaciones recientes como la última comida e incluso una pregunta formulada minutos antes.

La paciente murió cuando Alzheimer ya no trabajaba en la institución. Se había trasladado a Heidelberg para trabajar con Emil Kraepelin, un psiquiatra que concebía las enfermedades mentales como una evolución en el tiempo. Fue allí donde se envió el cerebro de Auguste Deter para que Alzheimer lo examinara, ya que había puesto a punto un gran laboratorio de histopatología. Ese fue el primer paso para desentrañar cuales eran los cambios responsables de los síntomas de la paciente. Un primer análisis del cerebro confirmó la gran atrofia y pérdida neuronal que este había sufrido. Ahondando más y junto con dos científicos italianos, Gaetano Perusini y Francesco Bonfiglio, analizaron cortes histológicos y descubrieron otros cambios que se podían ver tanto en el interior de las neuronas restantes, que correspondían a agregados en forma de fibras, como en el exterior de estas dónde encontraron unos agregados en forma de placas dispersas por toda la corteza cerebral.

El cerebro de Auguste Deter mostraba lo que hoy en día se conoce como los cambios neuropatológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer: los ovillos neurofibrilares, formados por la proteína tau, y las placas amiloides, formadas por la agregación del péptido beta amiloide (A β).

Sin embargo no fue hasta años más tarde que estos hallazgos se reconocieron por parte de la comunidad científica como una nueva enfermedad y se le dio a esta el nombre de “enfermedad de Alzheimer”, con el respaldo de Kraepelin. Más tarde, el mismo Alzheimer describió un segundo caso correspondiente al paciente Johann F., que mostraba síntomas similares a la paciente

anterior. El hecho más relevante es que al examinar el cerebro de este paciente, se pudo ver la presencia de placas amiloides pero no se encontraron ovillos neurofibrilares (revisado en (Snowdon et al., 1996), (Dahm, 2006)). La figura 2 muestra los dibujos hechos por el propio Alois Alzheimer cuando realizaba el seguimiento de la paciente Auguste Deter.

Desde el estudio inicial arriba descrito no se hicieron demasiados avances en la descripción de la enfermedad, hasta que en 1960 la microscopia electrónica permitió una más exhaustiva observación de los cambios estructurales característicos de la patología (Selkoe, 2001). Más adelante, en 1970, se observó, en muestras de corteza e hipocampo de pacientes, que en la enfermedad había una alteración en la actividad de las enzimas encargadas de degradar o sintetizar la acetilcolina, provocando una degeneración en las neuronas colinérgicas que llevó a formular la “hipótesis colinérgica”. Esta hipótesis postulaba que la enfermedad era causada por una reducción de la síntesis de acetilcolina, basándose en el recién adquirido rol del neurotransmisor acetilcolina en las funciones cognitivas, y en que los pacientes sufrían de memoria y demencia (revisado en (Contestabile, 2011)). Esto provocó un aumento en de la investigación focalizada en restablecer los niveles de este neurotransmisor, aunque años más tarde, se vieron déficits en otros neurotransmisores que mostraban la gran heterogeneidad de la enfermedad (Selkoe, 2001).

A medida que se fueron identificando las características de las placas y los ovillos, empezó a surgir el debate de cuál de las dos desencadenaría la otra, y qué eventos moleculares serían los responsables de la etiología de la enfermedad.

La investigación hizo posible conocer mejor la naturaleza y las características de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, y este mayor conocimiento trajo consigo la formulación de una nueva hipótesis en 1992, por Hardy y Higgins (Hardy and Higgins, 1992). Esta hipótesis, llamada “hipótesis amiloide”, postula que, el péptido A β , elemento principal de las placas amiloides, es el principal inductor de la cascada neuropatológica que se produce en la enfermedad, que desencadena la formación de placas y la agregación de tau en ovillos neurofibrilares. Esto abrió un debate acerca de la veracidad de la hipótesis, y de si realmente la patología amiloide ocurre primero en la secuencia temporal de la enfermedad, que sigue vigente aún hoy en día.

1.1.3 Descripción, clínica y sintomatología.

La EA se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo más o menos lento, que afecta a regiones del cerebro vinculadas a la memoria, la personalidad, y el desempeño de actividades cotidianas (Jucker, 2006). Tal y como se ha indicado anteriormente es la forma más común de demencia, entendiendo demencia como un conjunto de enfermedades que afectan a la memoria y a la capacidad de llevar a cabo actividades rutinarias diarias. La edad normal en la que aparecen los síntomas ronda los 65 años, aunque en algunos casos, la aparición es más temprana y se suele asociar a mutaciones o alteraciones en los genes involucrados en la fisiopatología de la enfermedad (véase el apartado 1.1.5). Estos casos se engloban dentro del conjunto denominado Alzheimer familiar de inicio precoz, que corresponde a un bajo porcentaje del total. Al resto de casos, la mayoría, se les denomina Alzheimer esporádico de inicio tardío (Alberca, 2011). En personas mayores de 80 años, la enfermedad no suele durar más de 3 o 4 años, pero ese periodo puede ser más largo en pacientes más jóvenes (Rodgers, 2011).

Los síntomas característicos de la enfermedad se hacen patentes tiempo después de que se hayan empezado a producir lesiones cerebrales. De este modo, podemos diferenciar varias fases en la enfermedad (adaptado del libro (Rodgers, 2011)):

- ✓ Fase pre-clínica: la enfermedad empieza a producir cambios en el cerebro del enfermo mucho antes de que los síntomas sean detectables. Esos cambios empiezan en la corteza entorrinal, una región cerebral próxima al hipocampo. Las neuronas que forman esta región empiezan a morir y el proceso se esparce hasta el hipocampo. Estos cambios se cree que ocurren hasta 20 años antes de que empiecen los síntomas.
- ✓ Fase inicial clínica o temprana: en esta fase encontramos los primeros síntomas detectables de la enfermedad, especialmente errores en la memoria episódica del paciente, es decir, la que está vinculada a la recuperación de información relacionada con eventos recientes (Almkvist et al., 1998). Estos cambios se producen debido a alteraciones estructurales en el hipocampo, y a menudo se confunden con cambios normales debido al envejecimiento. Por ese motivo a veces no se clasifican como demencia, aunque el déficit cognitivo suele ser un poco superior a lo esperado. Es lo que se denomina deterioro cognitivo leve (DCL, o MCI del inglés *Mild cognitive impairment*). Un elevado porcentaje de pacientes con DCL acaba derivando en EA (Alberca, 2011). Esta etapa puede durar años sin sufrir mayores cambios. Estudiar esta etapa de la enfermedad es muy importante puesto que nos ayudará a conocer cuáles son los factores que hacen que algunos pacientes deriven en EA y otros no.
- ✓ Fase leve: a medida que la acumulación de placas y ovillos se esparce por el hipocampo y la corteza, aparecen otros cambios y síntomas en el paciente. La pérdida de memoria se vuelve más evidente y aparecen problemas conductuales (agresión, ansiedad, depresión), cambios en la personalidad, aumento de la confusión que puede provocar que el paciente no sepa dónde está, se reduce la capacidad de juicio y razonamiento. Es en este punto dónde normalmente aparece la palabra Alzheimer en el diagnóstico del paciente.
- ✓ Fase moderada: esta fase se caracteriza por una afectación del lenguaje puesto que las áreas corticales responsables de este se ven afectadas, y los ventrículos se han agrandado. La memoria cada vez se ve más afectada, y aparecen más problemas conductuales como alucinaciones, repetición de movimientos, desinhibición descontrolada, incapacidad para pensar lógicamente, incapacidad para aprender cosas nuevas, pérdida del control de los impulsos. Esto hace que el grado de dependencia del paciente hacia su cuidador aumente, ya que el paciente no entiende muchas de las situaciones que vive o de las tareas que se le piden.
- ✓ Fase avanzada o grave: Finalmente, el paciente pasa por una última etapa en la que es incapaz de reconocer a nadie, incluso a ellos mismos en un espejo, y se vuelven totalmente dependientes del cuidador. Pueden llegar a perder peso, tener dificultades para tragar, se olvidan de tareas básicas como sentarse o andar, sufren incontinencia, pueden permanecer horas inmóviles o durmiendo, casi como en estado vegetativo. Esta dificultad de tragar a menudo deriva en pulmonía, una de las causas más frecuentes de muerte en estos pacientes, debido a que cuando el paciente no traga correctamente, la comida o los líquidos van a parar a los pulmones.

1.1.4 Aspectos diagnósticos.

El diagnóstico precoz es uno de los puntos clave en la investigación actual. Desarrollar terapias y que éstas sean efectivas solo tendrá sentido si se aplican cuando los signos de la enfermedad son

muy leves o casi inexistentes, y la memoria y otras funciones fisiológicas no se han visto afectadas. La neuroimagen es una herramienta muy potente y utilizada hoy en día como parte fundamental en el diagnóstico de la enfermedad, dado que nos aporta datos fiables sobre el volumen del lóbulo temporal y de la corteza entorrinal. (Burton et al., 2009).

El diagnóstico empieza con una visita del paciente al médico debido a una pérdida de memoria recurrente, y en otros casos, por trastornos relacionados con el lenguaje o la vista. Es importante, como primer paso, recopilar la historia clínica y saber si hay antecedentes familiares, así como comprobar el estado de diferentes factores de riesgo y descartar otras patologías que podrían estar relacionadas con la pérdida de memoria (ver apartado 1.1.5) (Alberca, 2011, PwC, 2013).

El segundo paso es la exploración neuropsicológica para determinar las características del daño cognitivo y su intensidad. En este punto se efectúan un conjunto de ejercicios enfocados a evaluar los trastornos detectados en cada paciente y se suele realizar en diferentes fases (Alberca, 2011).

Una vez se tienen todos los datos recopilados, para el diagnóstico de la enfermedad se suelen utilizar los criterios del grupo NINCDS-ADRDA (del inglés *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) o los del DSM-IV, de la Asociación americana de psiquiatría. Estos criterios sirven para descartar otras demencias (McKhann et al., 1984).

A pesar de todo, el diagnóstico definitivo de la enfermedad solo es posible a través de un estudio del cerebro post-mortem.

1.1.5 Etiología de la enfermedad. Factores de riesgo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mayoría de casos de Alzheimer corresponden al tipo esporádico, aunque encontramos un conjunto de factores de riesgo genéticos y no genéticos que pueden intervenir en su aparición.

Factores de riesgo no genéticos:

La edad avanzada es uno de los principales factores de riesgo. A medida que esta aumenta, el riesgo de padecer la enfermedad es mayor. En un proceso normal de envejecimiento, es posible encontrar similitudes entre un cerebro sano y un cerebro con EA, ya sea por la presencia de placas como por la pérdida de volumen cerebral y el ensanchamiento de los ventrículos. Sin embargo, aunque estos cambios pueden producir alteraciones en áreas motoras, sensoriales, o de asociación, éstas no son tan graves como las que se producen en la enfermedad (Alberca, 2011). También influye la historia familiar y el nivel de educación, estableciéndose que las personas con un bajo grado de escolarización pueden tener más probabilidad de desarrollar EA (Snowdon et al., 1996). Otro factor que parece tener un efecto es el género. Se cree que las mujeres tienen mayor riesgo de desarrollar EA que los hombres debido a los cambios hormonales que se producen a nivel de los estrógenos.

Factores de riesgo genéticos:

Gen de la apolipoproteína E (ApoE): El principal factor de riesgo genético es un polimorfismo del gen ApoE (Corder et al., 1993). Análisis genéticos recientes realizados con grandes poblaciones de pacientes, mediante los estudios llamados *Genome Wide Association*, han permitido identificar otros genes implicados, pero también han demostrado que la asociación con uno de los alelos del gen ApoE, en concreto el alelo $\epsilon 4$, es la más significativa (Coon et al., 2007, Alberca, 2011)

El gen ApoE, que se encuentra en el cromosoma 19, codifica para la apolipoproteína E, implicada en el transporte de colesterol y otras lipoproteínas. En el sistema nervioso central es expresada mayormente por los astrocitos, e interviene en el metabolismo del A β cerebral. De este gen existen 3 alelos diferentes (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) entre los cuales, el ϵ 3 es el mayoritario. Sin embargo, el alelo ϵ 4, menos frecuente en la población sana, se encuentra en un 40% de los enfermos con EA familiar de comienzo tardío o en los casos esporádicos (Strittmatter et al., 1993). El riesgo implícito por ser portador de este alelo varía según si está en homocigosis o no, factor que también influye en la cantidad de A β depositado, especialmente en las placas y los vasos, pero no en el parénquima (Chalmers et al., 2003), ya que este polimorfismo estaría implicado en la producción o la eliminación del péptido A β . En pacientes portadores de este alelo, se ha visto una mayor cantidad de placas amiloides (Schmechel et al., 1993). El riesgo es mayor entre los 65 y los 75 años, y desciende pasada esa edad donde influyen otros factores no identificados. Hay que tener en cuenta, también, que se pueden encontrar casos de personas homocigotas para este alelo que no han desarrollado síntomas de la enfermedad (Selkoe, 2001).

Alrededor de un 5% de los casos diagnosticados de EA, están englobados en un subtipo llamado enfermedad de Alzheimer de tipo familiar o de inicio temprano. En estos casos existen mutaciones genéticas de herencia dominante, directamente relacionadas con la aparición de la enfermedad, en tres genes: *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* (Alberca, 2011).

Gen de la proteína precursora amiloide (APP): localizado en el cromosoma 21 (21q21.3), este gen que codifica para la proteína precursora amiloide, levantó sospechas debido a la relación encontrada entre el Síndrome de Down (SD), en el que se produce una trisomía del cromosoma 21, y por lo tanto un aumento de la expresión de APP, y la EA (Lemere et al., 1996) Sin embargo la confirmación llegó tras el hallazgo de diversas mutaciones en el gen encontradas en familias con EA (St George-Hyslop et al., 1987, Chartier-Harlin et al., 1991, Goate et al., 1991). Hasta el día de hoy se han encontrado 32 mutaciones de este gen descritas en 86 familias (Alberca, 2011). La mayoría de estas mutaciones se encuentran cerca de los sitios implicados en la proteólisis de la APP, y determinan cuáles serán las enzimas responsables del procesamiento proteolítico de ésta, ya sea mediante α - y γ -secretasas en la llamada vía no amiloidogénica, o mediante β - y γ -secretasas en la vía amiloidogénica característica de la enfermedad (ver apartado 1.2.2 para más información). En este grupo de casos, la edad de aparición de los síntomas ronda los 50 años.

Otras alteraciones se encuentran dentro de la secuencia del péptido A β y conllevan un aumento de su capacidad de agregación, propiciando la formación de oligómeros (Selkoe, 2001)..

Las más comunes se describen a continuación, y su nombre está relacionado con la procedencia de las familias en las que se han encontrado:

- ✓ **Mutación *Swedish*:** esta mutación se encuentra en el codón 670/671 (KM670/671NL), justo al lado del punto de corte de la β -secretasa, causando una mayor afinidad por el sustrato (Mullan et al., 1992). Además de incrementar la producción de A β , también influye en el compartimento celular en el que la enzima actúa cortando la APP.
- ✓ **Mutación *London*:** es la mutación más común y corresponde al cambio de una Valina por una isoleucina en la posición 717 (Val717Ile) (Chartier-Harlin et al., 1991, Goate et al., 1991). Esta mutación se ha observado en unas 23 familias, y está asociada a un aumento de la generación de A β ₄₂ en relación a la de A β ₄₀. Se encuentra en el sitio de corte de la γ -secretasa y es una de las mutaciones comúnmente utilizadas para la generación de modelos animales (Hall and Roberson, 2012).

- ✓ **Mutación Dutch:** esta mutación, presente en 4 familias conocidas, se caracteriza por una mutación en la posición 693 (Glu693Gln) que no provoca ninguna alteración en los niveles de A β (Levy et al., 1990, De Jonghe et al., 1998), sino que incrementa su capacidad de agregación. Además esta mutación resulta en la aparición del desorden vascular llamado angiopatía amiloide cerebral (CAA) (Levy et al., 1990).
- ✓ **Mutación Flemish:** se sitúa en el codón 692 (A692G), y se caracteriza por un fenotipo mixto de EA con disfunción cognitiva y procesos cerebrovasculares.

Cabe añadir que un 25% de las mutaciones que se encuentran en APP son duplicaciones de todo el gen (Thonberg et al., 2011).

En la figura 3 se puede ver la ubicación de las mutaciones.

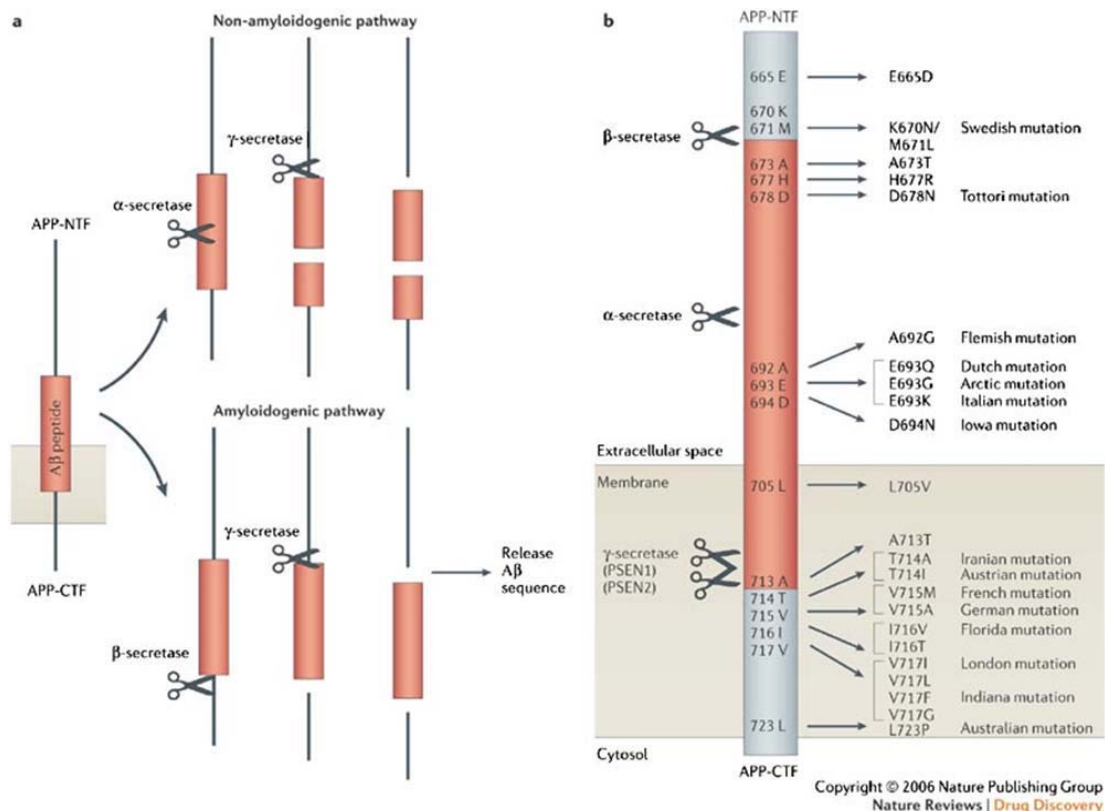


Figura 3. Procesamiento de APP y resumen de las mutaciones mayoritarias encontradas en el gen APP. A la izquierda podemos ver las dos vías de procesamiento de APP, y las secretasas implicadas. A la derecha se encuentra el nombre de las mutaciones, la posición y el aminoácido que se ve sustituido. Tomado de Van Dam and De Deyn, 2006.

Genes de las presenilinas 1 y 2 (PSEN1, PSEN2): se localizan en el cromosoma 14 (14q24.3) y en cromosoma 1 (1q31q42) respectivamente. Estos genes codifican para las proteínas presenilina 1 y presenilina 2, que forman parte del complejo de la γ -secretasa. Este complejo está compuesto por 4 subunidades, y estas dos proteínas constituyen el centro catalítico. La γ -secretasa participa en el procesamiento proteolítico de APP, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, liberando, en el segundo caso, el péptido A β (Selkoe, 2001).

El gen de la *PSEN1* fue descubierto en 1995 en un grupo de familias con EA de inicio precoz que no correlacionaban con marcadores del cromosoma 21 (Sherrington et al., 1995). Desde entonces, se han descrito 185 mutaciones en este gen, responsables de causar una EA de aparición muy temprana y agresiva. Las mutaciones en *PSEN1* son responsables del 75% de los casos de tipo

familiar, y debido a que éstas son más comunes y más severas, suelen ser las más utilizadas a la hora de generar un modelo animal transgénico (Bertram and Tanzi, 2004).

En el caso del gen de la *PSEN2*, su identificación fue posible gracias al proyecto de secuenciación del genoma humano, donde se encontró una homología con la *PSEN1* del 62%. La primera mutación se identificó en una familia alemana (Levy-Lahad et al., 1995). Hasta la fecha, se han encontrado 13 mutaciones en el gen *PSEN2*, y son responsables de menos del 5% de los casos de tipo familiar (Bertram and Tanzi, 2004).

Otros genes: se han descrito otros genes asociados recientemente con EA de inicio tardío. Algunos son: *BIN1*, *ABCA7*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, aunque sus efectos son mínimos. Estudios mediante ratones *knockout* (KO) para estos genes ayudarán a esclarecer el papel de cada uno de ellos y su relación con la EA (Jun et al., 2010, Hollingworth et al., 2011, Naj et al., 2011).

A modo de resumen, en esta página web se recogen todas las mutaciones y publicaciones relacionadas para cada gen: <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/default.cfm?MT=1&ML=1&Page=MutByGene>.

1.2 Bases moleculares de la enfermedad

1.2.1 Proteína precursora amiloide (APP)

En humanos, el gen que codifica para la proteína precursora amiloide o APP fue clonado por primera vez en 1987 (Kang et al., 1987). Se encuentra en el brazo largo del cromosoma 21 (21q21.3) y contiene 18 exones. El *splicing* alternativo de *APP* genera mRNAs de diferentes tamaños desde 365 a 770 aminoácidos, donde encontramos APP695, APP751 y APP770 como las mayoritarias y siendo APP695 la que se expresa de forma predominante en las neuronas (Sisodia et al., 1993). El mRNA de *APP* se expresa en una gran variedad de tejidos que incluyen el sistema nervioso (cerebro, médula espinal y retina), el sistema inmunitario (timo y bazo), u órganos como músculo, riñón, pulmón, páncreas, próstata y tiroides (Dawkins and Small, 2014).

En ratones, esta proteína contiene también el dominio A β , pero difiere del dominio humano por 3 aminoácidos. Concretamente, difiere de una Histidina en la posición 13 que hace que tenga menos tendencia a la agregación. Por ese motivo, en los modelos murinos de la enfermedad se necesita sobreexpresar la proteína APP humana para conseguir un buen modelo de estudio (De Strooper et al., 1995).

La proteína pertenece además a la familia de proteínas de membrana de tipo I, que en humanos, así como en otras especies de mamíferos, comprende otras dos proteínas semejantes, APLP1 y APLP2 (*amyloid precursor-like protein*), codificadas en los cromosomas 19 y 11, respectivamente. Así mismo, se han encontrado proteínas homólogas y genes ortólogos en otros organismos como en *Drosophila melanogaster* (APPL), y *Caenorhabditis elegans* (APL-1) (Thinakaran and Koo, 2008).

Las proteínas de esta familia se expresan abundantemente en el cerebro. La expresión de APLP1 está restringida a neuronas, en cambio APP y APLP2, aunque están enriquecidas en el cerebro, se pueden encontrar en otros tejidos (Lorent et al., 1995).

Respecto a su localización subcelular, tanto APP como las APLPs se encuentran en el soma, dendritas y axones de las neuronas (Hoe et al., 2009). Su expresión es mayor durante la maduración y diferenciación neuronal y dentro de la célula son transportadas rápidamente por el axón mediante transporte anterógrado mediado por vesículas, momento durante el cual APP es

procesada (Koo et al., 1990). El transporte hacia el axón se lleva a cabo mediante un sistema de transporte rápido axonal anterógrado, mediante kinesina-1 como proteína motora (revisado en (Thinakaran and Koo, 2008)).

APP está formada estructuralmente por varios dominios que se pueden plegar de forma independiente, tal y como se puede ver en la figura 4.. La región extracelular, mucho más larga que la intracelular, se divide en dos dominios E1 y E2, ligados por un dominio de tipo ácido. El dominio E1 es de tipo globular rico en cisteínas, y se puede dividir en dos regiones: el dominio de unión a heparina (HBD), y el dominio de unión a cobre (CuBD). El dominio E2 es rico en hélices alfa y contiene también un dominio HBD y otro dominio de unión a metales (Dawkins and Small, 2014). Estos dos dominios extracelulares están altamente conservados entre las proteínas de la misma familia, y junto con el dominio intracelular serían los responsables de llevar a cabo sus funciones fisiológicas inherentes. El dominio intracelular contiene diferentes sitios de fosforilación y un motivo YENPTY de internalización (Dawkins and Small, 2014). En cambio, el dominio del péptido A β no está conservado y es exclusivo de APP (Zheng and Koo, 2006). La estructura cristalizada completa de la proteína aún no se ha resuelto.

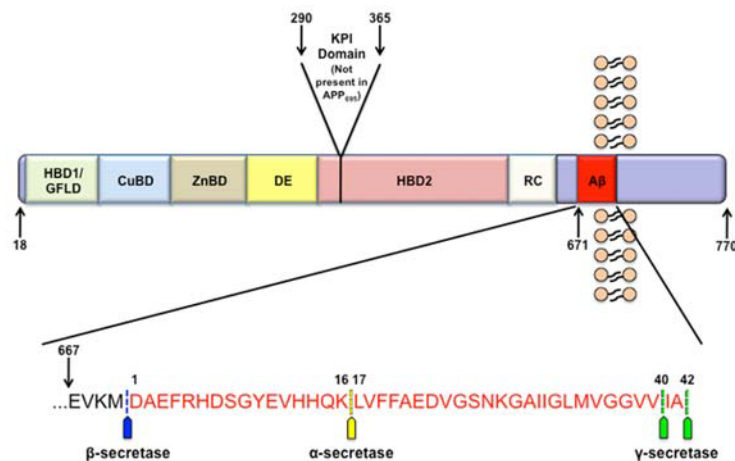


Figura 4. Estructura de la proteína APP. El primer dominio HBD es el de unión a heparina, CuBD es el dominio de unión a cobre; ZnBD es el dominio de unión a Zinc; DE es el dominio ácido; HBD2 es otro dominio de unión a heparina; RC es el dominio *random coiled*, y A β es la región que corresponde a este péptido. Tomado de Lazarov Orly, 2012.

Funciones biológicas

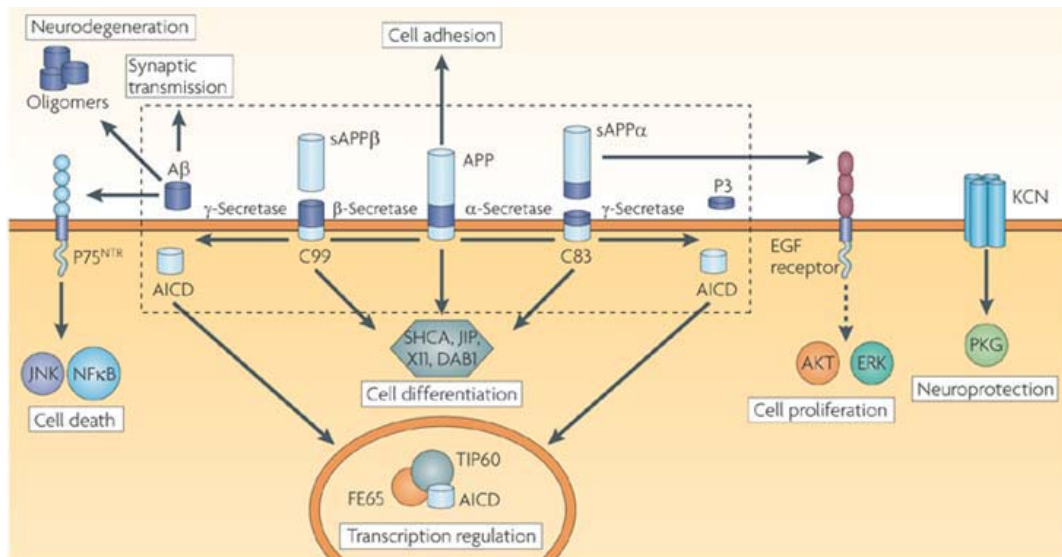
APP es una glicoproteína transmembrana de la que no se sabe con exactitud su función primaria. Sin embargo, existen evidencias de que tiene un papel crítico en diferentes etapas del desarrollo embrionario. En lo que respecta al sistema nervioso central (SNC) o al periférico (SNP), se la ha relacionado con la formación de nuevas sinapsis y la unión neuromuscular, la plasticidad neural, la migración de precursores neurales hacia la corteza cerebral, o el crecimiento neurítico (O'Brien and Wong, 2011, Nalivaeva and Turner, 2013). En el adulto, participa en la homeostasis del calcio, esencial para la transmisión sináptica (Octave et al., 2013) así como en la respuesta al daño neuronal (Alberca, 2011).

Des de su clonación, se pensó que APP podría ser un receptor de la superficie celular debido a las similitudes, tanto estructurales como de procesamiento, con el receptor de Notch. Aunque se han identificado varias proteínas que interactúan con APP como Nogo66-receptor (Park et al., 2006), o Netrina-1, molécula implicada en guía axonal (Lourenco et al., 2009), faltan pruebas fehacientes del papel de APP como receptor.

La secuencia extracelular de APP se ha visto que interacciona con diferentes componentes de la matriz extracelular como heparina, colágeno de tipo I, y laminina. También se ha visto que podría estar implicada en la adhesión celular (Muller and Zheng, 2012), e interaccionando con moléculas de adhesión celular como integrinas, puesto que APP colocaliza con integrinas en la superficie de axones y en sitios de adhesión (Storey et al., 1996, Yamazaki et al., 1997). Otros estudios han demostrado que APP está implicada en la migración de precursores neurales a la placa cortical, mediado por Dab1 que actuaría más abajo en esa vía (Young-Pearse et al., 2007).

También se les han atribuido funciones a las fracciones solubles de la proteína que se liberan después de su procesamiento (revisado en (Zheng and Koo, 2011)). Estos fragmentos solubles derivados del procesamiento de APP por parte de la α -secretasa llamados α APPs, son capaces de mejorar la memoria en animales y de aumentar la densidad sináptica (Roch et al., 1994, Meziane et al., 1998). Se liberan de forma constitutiva de la célula, indicando que pueden tener funciones autocrinas y paracrinas en la regulación del crecimiento (Thinakaran and Koo, 2008). También se ha visto que puede estimular el crecimiento neurítico, e inducir diferenciación de células madre neurales al linaje astrocítico (Kwak et al., 2006). En cerebros de ratón adulto también se ha visto que actúa con el factor de crecimiento epidérmico (FCE o EGF, del inglés *epidermal growth factor*) para estimular la proliferación de células madre neurales de la zona subventricular, como si fuera un cofactor (Caille et al., 2004).

El péptido AICD mencionado en el apartado anterior, es liberado intracelularmente, y suele participar en señalización celular. Se ha visto que AICD puede formar un complejo activo de transcripción junto con otras moléculas como Fe65 o Tip60 (Cao and Sudhof, 2001). Otras evidencias apuntan a que la liberación de AICD podría estar involucrada en la supresión de la neurogénesis dependiente de su unión a Fe65, aunque esta vía no se sabe si está activa *in vivo* (Ma et al., 2008). (Ver figura 5)



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 5. Funciones biológicas de los fragmentos de la proteína APP. El procesamiento proteolítico de APP da lugar a varios fragmentos proteicos que se han relacionado con diferentes funciones celulares, tanto a nivel de adhesión celular, como en la diferenciación celular o la transcripción génica en el caso del péptido AICD. Tomado de Willnow TE, 2008.

Los modelos tipo *knockout* (KO) son una herramienta esencial para desentrañar las funciones de una proteína. Sin embargo, en ratones KO para APP se ha visto que esta proteína no es imprescindible durante el desarrollo ya que los ratones son fértiles y viables (Zheng et al., 1995), aunque en los casos de doble KO de APLP1 y APP o APLP2 y APP, los ratones mueren al nacer (Heber et al., 2000, Anliker and Muller, 2006). Esto sugiere que las funciones de APP se solaparían con las de estas dos proteínas de su misma familia, existiendo un mecanismo compensatorio en los casos de KO simple de APP.

1.2.2 Procesamiento de APP. Implicación en la enfermedad

Por lo que respecta al procesamiento post-transcripcional de APP, la proteína está sometida a diversas modificaciones. Una vez sintetizada, APP es translocada al retículo endoplasmático (RE) mediante su péptido señal y seguidamente, en su camino hacia la membrana plasmática, en la vía de secreción, es modificada mediante procesos de N- y O-glicosilación, fosforilación y sulfatación de tirosinas, que ocurren poco después de su síntesis, así como diferentes tipos de procesamientos proteolíticos para generar fragmentos peptídicos. En células

de tipo no neuronal, cuando APP llega a la membrana, se internaliza rápidamente gracias al motivo YENPTY y vuelve a la membrana después de ser reciclada en los endosomas, o es degradada en los lisosomas (Thinakaran and Koo, 2008, Haass et al., 2012). Su vida media es de unos 45-60 minutos aproximadamente.

A continuación se describen 2 de estos procesos:

- ✓ **Fosforilación:** APP puede ser fosforilada en múltiples puntos tanto en el dominio intracelular como en el extracelular. Entre estos puntos, hay uno que corresponde al dominio intracelular llamado "motivo VT⁶⁶⁸PEER" que puede ser fosforilado por varias cinasas, como CDK5, GSK3 β o JNK1. La fosforilación en este punto podría regular su localización intracelular, contribuir a una mayor producción de A β o estar relacionado con su posterior procesamiento por caspasas. También podría afectar a su unión con Fe65, afectando así a la señalización celular (Zheng and Koo, 2011).
- ✓ **Proteólisis:** Podemos distinguir dos vías de procesamiento proteolítico que se diferencian en las enzimas responsables de este proceso, la vía no amiloidogénica y la amiloidogénica, representadas en la figura 6.. En la primera de ellas, la vía normal de procesamiento del APP, la proteína es cortada por proteasas de la familia de las secretasas, concretamente la α -secretasa, que corta en el extremo más próximo a la parte N-terminal, y la γ -secretasa. El primer corte realizado por la α -secretasa libera un fragmento largo llamado sAPP α al espacio extracelular, dejando un fragmento de 83 aminoácidos anclado a la membrana llamado α CTF del inglés *COOH-terminal fragment* o C83. Después del segundo corte por la γ -secretasa se libera un péptido intracelular llamado AICD por su nombre en inglés *amyloid precursor protein intracellular domain*, liberado en el citosol, que tiene un papel en la señalización nuclear (von Rotz et al., 2004). Sin embargo, en la vía amiloidogénica, productora de los depósitos amiloides en la EA, la primera secretasa que corta esta proteína es la β -secretasa, cuyo punto de corte se sitúa unos aminoácidos más arriba que el de la α -secretasa. Esto resulta en la formación de un primer péptido llamado sAPP β , dejando otro fragmento llamado β CTF o C99 anclado a la membrana. Este es cortado por la γ -secretasa, liberando el péptido A β y un péptido intracelular. Esta vía se describirá en mayor detalle en el apartado 1.3.

El procesamiento proteolítico de APP se cree que está ligado a su presencia en las llamadas “balsas lipídicas” o *rafts* lipídicos (en inglés *lipid rafts*), unos microdominios de membrana ricos en colesterol que parecen estar involucrados en la homeostasis del colesterol, angiogénesis y transducción de señales. De este modo, cuando se encuentra en estas regiones de la membrana, APP es más accesible a la β -secretasa, a diferencia de cuando no se encuentra en estas áreas que es procesado por la α -secretasa (Ehehalt et al., 2003). De hecho, es en la membrana donde se encuentra con la α -secretasa y puede ser cortado, a diferencia del corte mediante β -secretasa, que se produce durante la endocitosis, donde APP se encuentra con las β y γ -secretasas (Thinakaran and Koo, 2008). Una vez finalizado este proceso, el endosoma se recicla en la superficie celular liberando el péptido A β generado junto con el sAPP β . También hay evidencias de que α -secretasa puede cortar en el proceso de transporte de la proteína a la membrana (revisado en (Haass et al., 2012)).

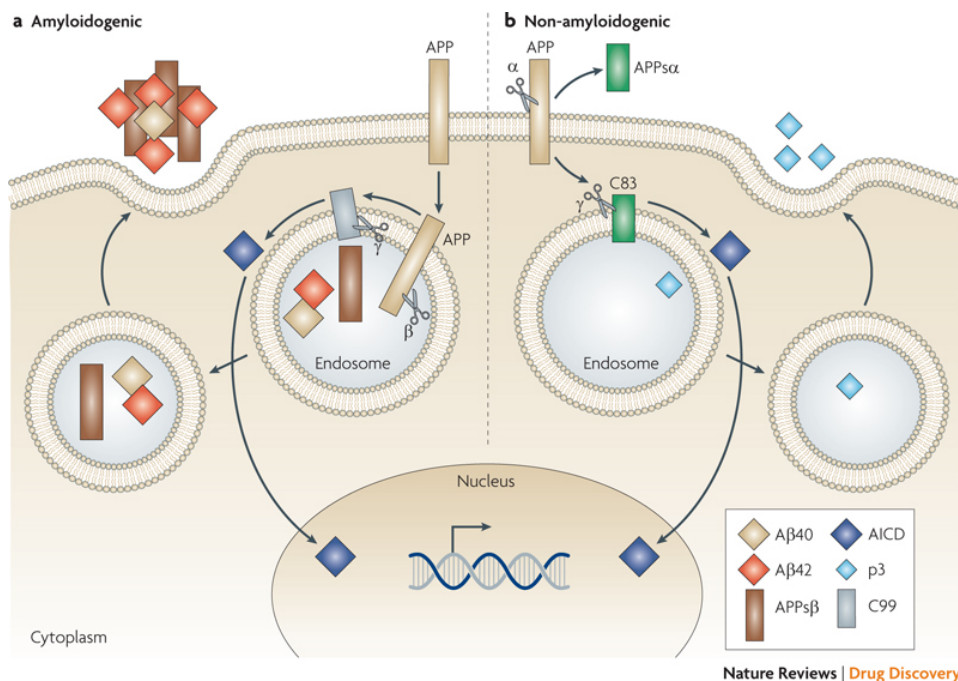


Figura 6. Esquema de la proteólisis de la proteína APP por las vías amiloidogénica y no amiloidogénica. A la izquierda, en la vía amiloidogénica, podemos ver como APP es internalizado y cortado las secretasas, liberando el péptido A β . En cambio, en la vía no amiloidogénica, el primer corte proteolítico se produce en la membrana. Tomado de Aguzzi A., 2010.

Se ha visto en estudios de sobreexpresión de APP, que aproximadamente solo un 10% del total se encuentra en la membrana, mientras que el resto de moléculas de APP se encuentra en el aparato de Golgi y su red de vesículas. Desde el Golgi también puede ser transportado a los endosomas.

Las dos vías parecen competir debido a que un aumento en la actividad de α -secretasa en modelos de la enfermedad o en cultivos celulares, puede disminuir significativamente la generación de péptido A β e incluso la formación de placas (Postina et al., 2004). También se ha visto que mutaciones en el motivo YENPTY inhiben la internalización de APP y disminuyen la generación de A β (Perez et al., 1999).

α , β , y secretasas

Como se ha comentado anteriormente, la proteína APP es procesada por diversas secretasas que se detallaran a continuación.

α-secretasa

Cuando APP se procesa por la vía no amiloidogénica, se produce un corte dentro del dominio Aβ, entre los aminoácidos Lys16 y Leu17 (Esch et al., 1990, Wang et al., 1991). Esto resulta en la formación del péptido αCTF o C83. Este primer procesamiento es llevado a cabo por las α-secretasas, en la membrana celular, (Sisodia, 1992), unas metaloproteinasas de zinc de la familia ADAM (del inglés *a desintegrin and metalloprotease*), aunque también se ha visto actividad de α-secretasa en el trans-Golgi, dependiente de proteína cinasa C (PKC) (Mills and Reiner, 1999). El miembro principal que parece ser responsable de este procesamiento es ADAM10, al menos en neuronas, que se expresa en la corteza y el hipocampo del SNC adulto (Kuhn et al., 2010), aunque otros miembros de la familia como ADAM9, ADAM 17 o ADAM19 podrían funcionar como α-secretasas (Allinson et al., 2003).

β-secretasa

En la EA, es la β-secretasa la encargada de procesar APP, que provocará la formación del péptido Aβ. A esta secretasa también se la conoce como BACE1 (*beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*), y fue identificada en 1999 (Sinha et al., 1999, Vassar et al., 1999, Yan et al., 1999). Otra proteasa homóloga fue identificada años después, BACE2, aunque no está implicada en amiloidogénesis (Bennett et al., 2000). BACE1 se expresa constitutivamente pero los niveles más elevados se encuentran en el cerebro y en el páncreas. Se cree que puede tener un papel en la mielinización, debido a los altos niveles de BACE1 presentes durante el estadio postnatal (Willem et al., 2006), y a la hipomielinización del SNP en animales KO para BACE1 (Hu et al., 2006). Se localiza principalmente en el trans-golgi y en compartimentos endosomales (Selkoe, 1998).

γ-secretasa

Los dos tipos de procesamiento mencionados anteriormente, liberan unos péptidos llamados APPs α o β, y dejan anclado a la membrana el fragmento C-terminal o CTF. Este fragmento es procesado por la γ-secretasa. γ-secretasa es un complejo formado por 4 subunidades entre los que se encuentran las presenilinas 1 y 2, que son parte del dominio catalítico, nicastrina, APH-1 (del inglés *anterior pharynx defective 1*) y PEN-2 (del inglés *presenilin enhancer 2*) (Yu et al., 2000). Estos componentes son suficientes y necesarios para la completa actividad de γ-secretasa. Esta proteasa actúa posteriormente a las dos secretasas anteriores, pero los productos que se liberan difieren en ambos casos. El procesamiento de APP por γ-secretasa no está restringido a un único sitio, si no que parece ser que APP sufre un procesamiento secuencial, que da lugar al dominio intracelular o AICD, y a la formación de péptidos de diferente tamaño. En la enfermedad de Alzheimer, este péptido recibe el nombre de Aβ, y está formado predominantemente por 40 o 42 aminoácidos (revisado en (Haass et al., 2012)).

1.2.3 Tau

La proteína tau, descubierta en 1975, es una proteína de 55 kDa codificada por el gen *MAPT* en humanos, que se encuentra en el cromosoma 17 (17q21). Tiene unas 100 kb y contiene como mínimo 16 exones (Avila et al., 2004).

Como se puede observar en la figura 8. existen 6 isoformas de tau debido al *splicing* alternativo de diferentes exones: 2, 3 y 10, aunque el exón 3 no aparece nunca independientemente del 2 (Andreadis et al., 1995). Debido a que el exón 10 está relacionado con la presencia de uno de los dominios de unión a microtúbulos, su presencia o ausencia está relacionada con su mayor o menor capacidad de unirse a estos. Entonces diferenciamos las isoformas 3R, sin el exón 10 y con solo 3

dominios de unión, o las 4R con cuatro y por tanto mayor afinidad a microtúbulos. Según la presencia de los exones 2 y 3 diferenciamos también entre 0N, 1N o 2N.

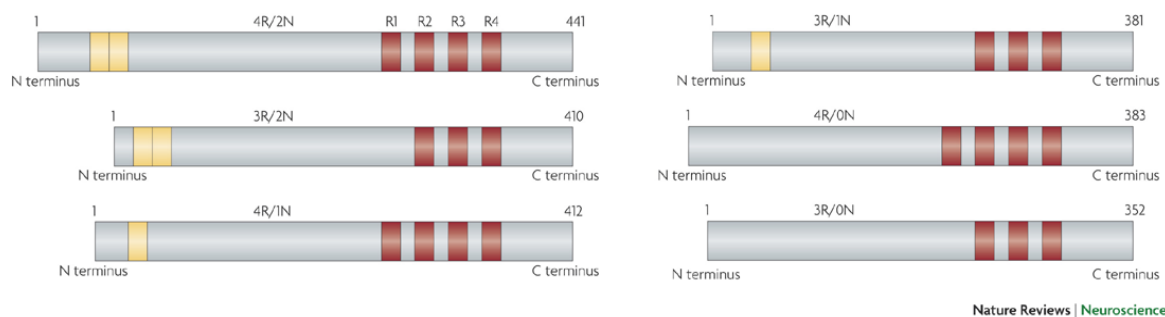


Figura 7. Isoformas de tau. Existen dos bloques de isoformas que se dividen según el número de repeticiones de unión a microtúbulos que tiene. Así encontramos las 3R con 3 dominios y las 4R con 4. Además, de cada bloque existen 3 isoformas según la presencia o ausencia de los exones 2 y 3. Tomado de Ballatore C., 2007.

Durante el desarrollo, las isoformas del tipo 3R son las mayoritarias, aunque también se encuentran en tipos celulares específicos como las células granulares o del giro dentado (Goedert et al., 1989). En cambio en el cerebro adulto, el ratio 4R/3R es próximo a 1, y es mantenido incluso durante la EA. Sin embargo, en taupatías como la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17), se pueden encontrar alteraciones en estas proporciones. Mutaciones en el gen que codifica tau, solo da lugar a demencia frontotemporal (DFT, o FTD del inglés *frontotemporal dementia*), pero no a EA.

Se ha encontrado recientemente en el intrón 9 del gen humano, una región que se comporta como un exón y que da lugar a la expresión de una proteína conocida como *saithein*, y cuya mutación del tipo Q7R correlaciona con una mayor incidencia de EA u otras taupatías (Avila et al., 2004).

En ratón, el gen que codifica para tau se encuentra en el cromosoma 11. Las isoformas que presenta difieren según el estadio del desarrollo, expresándose mayoritariamente la isoforma 0N3R durante el desarrollo embrionario, mientras que en el adulto se expresan solo las 3 isoformas del tipo 4R.

Existen otras proteínas similares a tau como MAP1 o MAP2, que se expresan preferentemente en el cerebro, aunque también en otros tejidos, donde están menos representadas, o MAP4, codificada por el cromosoma 3 y con homología en la zona de unión a tubulina. También se han encontrado proteínas similares en *C. elegans* (Goedert et al., 1996), y *Drosophila melanogaster* (Irminger-Finger et al., 1990).

Esta proteína se expresa en las neuronas del SNC principalmente, aunque se ha encontrado tanto mRNA como proteína en tejidos como el corazón, el hígado, el páncreas, el pulmón, entre otros (Gu et al., 1996, Vanier et al., 1998).

A nivel celular, es una proteína intracelular que se encuentra asociada a microtúbulos gracias a su unión a tubulina, aunque también se puede encontrar asociada a la membrana plasmática (Brandt et al., 1995, Arrasate et al., 2000). Normalmente está localizada en los axones, donde estabiliza los microtúbulos y permite que el transporte axonal, tanto anterógrado como retrógrado, sea posible. Además, posibilita otros procesos como la diferenciación celular o la polarización que están relacionados con el citoesqueleto. También se expresa en astrocitos y oligodendrocitos. Ratones

deficientes de tau son viables (Harada et al., 1994) aunque presentan ligeras diferencias, probablemente debido a la compensación de otras proteínas.

Funciones biológicas

La principal función de tau es la de estabilizar a los microtúbulos a través de la interacción con la tubulina. De este modo, participa en el ensamblaje de monómeros de tubulina para formar los microtúbulos, así como para realizar funciones como el transporte axonal. Tau también hace de nexo de unión de los microtúbulos con otros elementos del citoesqueleto. Su función viene regulada por su estado de fosforilación, y por el número de dominios de unión a tubulina, que varían entre las diferentes isoformas (García and Jay, 2004). Todas las isoformas de tau presentes en el cerebro tienen la misma estructura, un dominio de proyección que contiene la mayor parte de la estructura, y el dominio de unión a microtúbulos, en la región C-terminal (Avila et al., 2004). El dominio de proyección se puede dividir en 2 regiones más, la región amino-terminal con una alta proporción de residuos ácidos, y la región rica en prolina (Avila et al., 2004). El dominio de unión a microtúbulos contiene 3 o 4 repeticiones de unos 30 residuos. Estas repeticiones permiten a tau unirse a microtúbulos y pueden provocar su ensamblaje (Trinczek et al., 1995).

La fosforilación de la proteína es un fenómeno regulado por el desarrollo, de forma que ésta es más elevada en el estadio fetal y disminuye con la edad. La proteína contiene un total de hasta 80 residuos susceptibles de ser fosforilados (figura 8), y el estado de fosforilación en el que se encuentren depende de un balance entre diversas cinasas y fosfatasa.

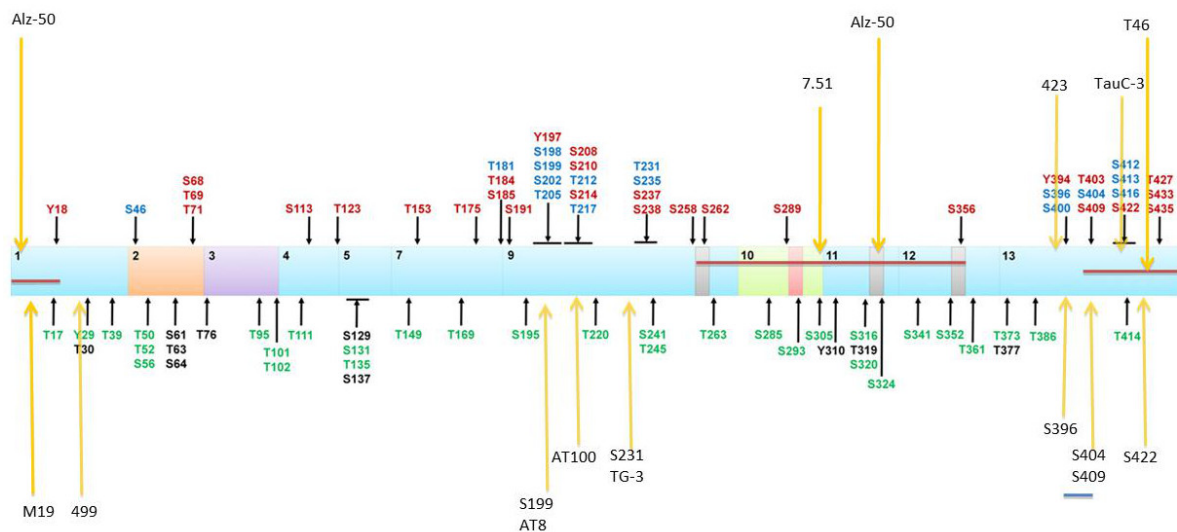


Figura 8. Sitios de fosforilación de tau. En la imagen se muestran todos los sitios de fosforilación de la proteína con el aminoácido al que corresponde y su posición en la secuencia. Tomado de Luna-Muñoz J., 2013.

Las cinasas principales que participan en este proceso se pueden dividir en dos grupos: las cinasas dirigidas a prolina o motivos prolina-serina/treonina, y las cinasas que fosforilan otros motivos. Algunas de las cinasas más conocidas y destacadas son: i) la glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), ii) la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), y iii) la cinasa reguladora de la afinidad por los microtúbulos (MARK). Respecto a las fosfatasas, se encuentra la fosfatasa 2 A (PP2A) (García and Jay, 2004). El estado de fosforilación también determina su localización intracelular, de forma que cuando es fosforilada en la región rica en prolina se encuentra principalmente en el compartimento somatodendrítico, mientras que cuando esta región no está fosforilada, o cuando

tau está fosforilada en el dominio C-terminal, se encuentra en la parte distal del axón (Dotti et al., 1987).

Existen otras modificaciones post-traduccionales que puede padecer tau, como la glicosilación, que podría tener un papel en la localización nuclear de la proteína (Lefebvre et al., 2003) o la glicación que podría estar relacionada con la agregación de tau en agregados más complejos (Ledesma et al., 1994). Además podemos encontrar formas de la proteína resultantes del corte de tau por su residuo 391 y que podría facilitar la agregación aberrante de la proteína (Basurto-Islas et al., 2008).

1.3 Neuropatología/alteraciones neuropatológicas

Desde la descripción del primer caso de EA, se desveló en la autopsia una pérdida de masa cerebral debido a una elevada muerte celular. También se observaron células que contenían unas estructuras fibrilares, así como la presencia de acumulaciones proteicas alrededor de estas. Hoy en día conocemos a estas estructuras neuropatológicas como ovillos neurofibrilares y placas amiloides, respectivamente.

En la figura 9 se pueden apreciar algunos de los cambios morfológicos debidos a la pérdida de masa cerebral.

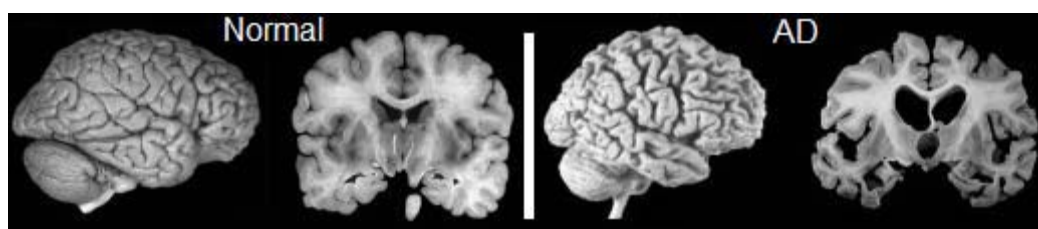


Figura 9. Morfología de un cerebro sano y de un cerebro de un paciente de Alzheimer. Vista lateral y vista coronal. Tal y como se puede ver en la vista lateral, las circunvoluciones están más separadas en el cerebro con EA y los surcos son más anchos. A nivel coronal vemos como los ventrículos son más anchos y existe una evidente degeneración en varias zonas, entre ellas la zona de la corteza y el hipocampo.

1.3.1 Placas amiloides y la hipótesis de la cascada amiloide

Las placas amiloides están formadas por acúmulos del péptido $A\beta$ y se suelen encontrar junto a axones y dendritas distróficos. Este péptido $A\beta$ se genera a partir del procesamiento proteolítico de su proteína precursora APP por la vía amiloidogénica. En esta vía participan β y γ -secretasas, introducidas anteriormente en el apartado 1.2.2. Esta vía no ocurre en la membrana, sino que la β -secretasa se encuentra con APP en las vesículas secretoras, y se generan diferentes tipos de péptidos $A\beta$ de diferente tamaño. El péptido $A\beta$ tiene tendencia a autoagregarse, especialmente el llamado $A\beta_{42}$ (McGowan et al., 2005). Una vez sintetizado en forma monomérica, mantiene un alto contenido en hélices alfa, pero llegado a un umbral de concentración, se produce un cambio de conformación a láminas beta, que facilita su agregación en oligómeros. Una vez formados estos oligómeros, se formaran protofibrillas, que se convertirán en fibras y finalmente se formarán las placas. La figura 10 muestra el aspecto de los oligómeros y las fibras por microscopia electrónica, junto con un posible modelo de la agregación de los mismos.

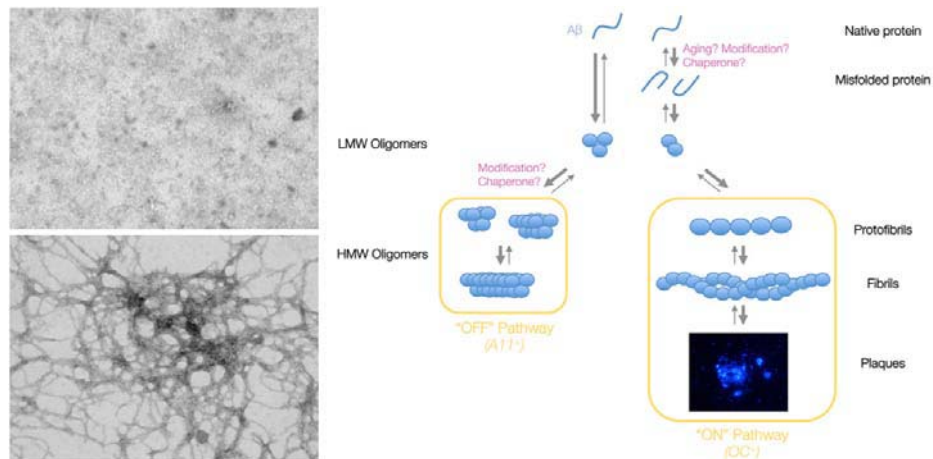


Figura 10. Estructura de los oligómeros y las fibras del péptido A β obtenida por microscopía electrónica. A la derecha, posible modelo agregación de los oligómeros de A β . En este modelo se postula que sería un cambio en el plegamiento del péptido A β que provocaría su agregación y formación de oligómeros. Este cambio de conformación también se produciría en cerebros sanos de personas mayores, apareciendo las placas, sin provocar la neurotoxicidad característica de los oligómeros. Tomado de Lesné, 2014.

Las formas solubles están formadas por oligómeros de bajo peso molecular, que se corresponden a complejos de 2, 3 o hasta 4 unidades de monómeros, mientras que los de mayor tamaño corresponden a los oligómeros de alto peso molecular (Walsh and Selkoe, 2007). Se pueden encontrar en el espacio intracelular o extracelular. Las formas insolubles corresponden a protofibrillas y fibrillas.

Podemos encontrar dos tipos diferentes de placas, las conocidas como placas difusas, y las placas neuríticas (ver figuras 11). Se diferencian en que las placas difusas son menos densas, generalmente solo contienen agregados de péptido A β , y no suelen estar asociadas a pérdida sináptica o glía reactiva. Este tipo de placas son las que también se pueden encontrar en gente mayor. Son negativas para Thioflavina-S y Congo Red. En cambio, las placas neuríticas están formadas por un núcleo compacto de A β fibrilar, rodeado por neuritas degeneradas o en proceso de degeneración con acumulaciones de tau y células gliales reactivas como astrocitos o microglía. Además, son positivas para los marcadores antes mencionados (Serrano-Pozo et al., 2011). También podemos encontrar depósitos de A β en las paredes de pequeños vasos sanguíneos (CAA) (Braak and Braak, 1996).

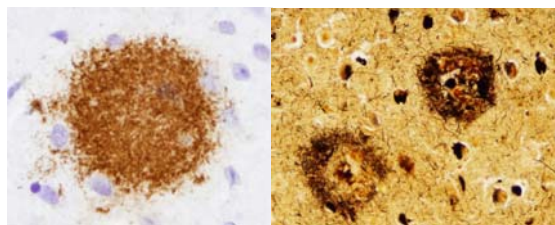


Figura 11. Placas amiloides características de la enfermedad de Alzheimer. A la izquierda, placas difusas, menos densas. A la derecha, placas neuríticas con un núcleo más denso.

En la EA, las placas se localizan en la isocorteza y van creciendo en número expandiéndose por toda la corteza, primero las áreas asociativas, hasta finalmente llegar a toda la isocorteza. En el

hipocampo sin embargo, no se encuentra un gran número de depósitos. Este patrón no se corresponde con la acumulación de ovillos neurofibrilares (Braak and Braak, 1991).

Aunque la presencia de placas es una de las lesiones más características de la enfermedad, su densidad correlaciona muy débilmente con el daño cognitivo de la misma. Hay evidencias que apuntan a los oligómeros de A β como los principales responsables del deterioro cognitivo característico de la EA. En este sentido, se ha demostrado que oligómeros solubles, encontrados en estadios iniciales de la enfermedad, cuando aún no hay presencia de placas, provocan alteraciones sinápticas que afectan a la plasticidad, al aprendizaje y a la memoria (Walsh et al., 2000, Walsh et al., 2002, Lesne et al., 2006, Shankar et al., 2008, Reed et al., 2011).

La cascada amiloide

Una de las hipótesis más estudiadas y sobre la que se ha trabajado en los últimos años, introducida en el apartado 1.1.2, es la “hipótesis de la cascada amiloide”. En esta hipótesis, formulada en 1992 por J.A. Hardy y G.A. Higgins (Hardy and Higgins, 1992), el péptido A β juega un papel central en la enfermedad, ya que se propuso que A β era el responsable inicial de la aparición de la neuropatología en la EA, produciéndose un conjunto de eventos moleculares que finalmente darían lugar al resto de alteraciones neuropatológicas, entre ellas la acumulación de tau. Estas conclusiones fueron sacadas a partir de casos de pacientes con SD, en los que se desarrolla la enfermedad sin encontrar taupatía, y por otros estudios genéticos e histopatológicos en los que se demostraba la toxicidad de A β , por lo que concluyeron que tau no era necesaria para desencadenar la enfermedad (Hardy and Higgins, 1992). Sin embargo, A β no induce degeneración en cultivos primarios neuronales que provienen de ratones KO para tau, hecho que sugiere un papel de tau en la degeneración mediada por A β (Rapoport et al., 2002).

Lo que sí parece demostrado es que tau actúa por debajo de A β ya que los efectos protectores de reducir la expresión de tau no provocan cambios en los niveles de A β o en su agregación. Además, diferentes estudios han demostrado que A β es capaz de inducir la hiperfosforilación de tau (De Felice et al., 2008).

Actualmente, la aceptación de la hipótesis amiloide sigue siendo un tema de debate, puesto que las aproximaciones de tratamientos realizadas con A β como punto central a tratar, han fracasado al llegar a fase III, poniendo en entredicho su veracidad (Karran et al., 2011). La hipótesis, sin embargo, tampoco puede ser rechazada ya que en el caso de los ensayos clínicos, el tratamiento se administra una vez el paciente presenta placas en la corteza. Estas placas son difíciles de disgregar y con el tratamiento solo se conseguiría frenar o ralentizar la producción de A β . El objetivo clave, entonces, sería encontrar un punto en la escala temporal de la enfermedad en la que se pudiera evitar la formación de las placas.

1.3.2 Ovillos neurofibrilares y la agregación de tau

En condiciones fisiológicas, tau se encuentra unida a microtúbulos en un equilibrio dinámico, gracias a un conjunto de cinasas y fosfatasas, que equilibran su estado de fosforilación. En la EA, ese equilibrio se rompe y tau se encuentra hiperfosforilada afectando a su capacidad de unión a tubulina y menguando su capacidad de estabilizar microtúbulos. Esta hiperfosforilación cambia, además, su localización intracelular, encontrándose mayoritariamente en el compartimento somato-dendrítico (Iqbal et al., 2009). Cuando la

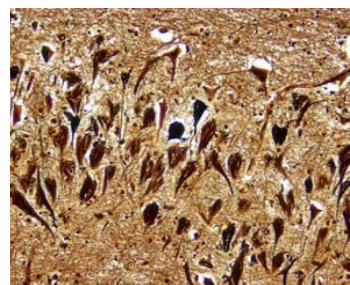


Figura 12. Ovillos neurofibrilares.

proteína tau se encuentra hiperfosforilada, adquiere resistencia a la proteólisis y se acumula en el citosol, formando agregados ricos en láminas β llamados filamentos pareados helicoidales (PHF, del inglés *paired helical filaments*) que posteriormente se convertirán en los ovillos neurofibrilares también conocidos como NFT (del inglés *neurofibrillary tangles*) (Avila et al., 2004), que pueden observarse en la figura 12.

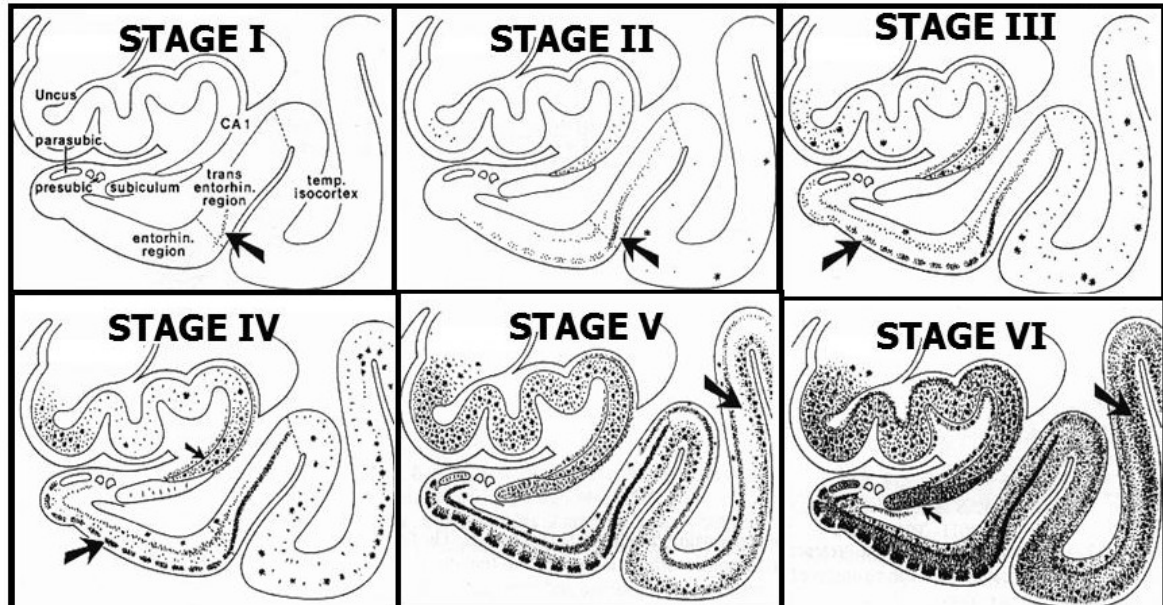


Figura 13. Estadios definidos por Braak y Braak, 1991.

Los ovillos neurofibrilares son acúmulos de proteína tau anormalmente hiperfosforilada que se localizan dentro de las neuronas distróficas del hipocampo, corteza entorrinal, giro dentado, amígdala y cortezas asociativas (Alberca, 2011). Estos ovillos fueron utilizados por Braak y Braak en 1991 para definir el avance de la enfermedad, la cual dividieron en 6 fases según el estado de propagación de los mismos por el cerebro, y que están representadas en la figura 13. En las primeras fases I y II, los primeros ovillos empiezan a aparecer en la región transentorrinal. Por eso se las conoce como estadios transentorrinales. Durante estas fases, no hay manifestación de que las capacidades intelectuales del paciente estén afectadas. En las fases III y IV, también llamadas estadios límbicos, las zonas transentorrinal y entorrinal se ven gravemente afectadas, especialmente la capa pre- α de ambas regiones, afectado a la comunicación entre la isocorteza y el hipocampo. Además, los ovillos empiezan a aparecer en el subículo y llegan hasta la región CA1 del *cornu ammonis* del hipocampo. Finalmente, en las últimas fases V y VI, la progresión de la enfermedad avanza hasta la isocorteza asociativa donde aparecen gran cantidad de ovillos. Este avance es bastante simétrico entre los dos hemisferios (Braak and Braak, 1991, 1996).

Actualmente existe una gran controversia en referencia al papel de los ovillos en la enfermedad. Hay estudios que apoyan la hipótesis de que podrían tener un papel neuroprotector evitando la presencia de tau soluble susceptible de provocar que otras moléculas dejen de estar unidas a los microtúbulos (Alonso Adel et al., 2006, Spires-Jones et al., 2008, Iqbal et al., 2009). En cambio, hay otras posturas que asocian los ovillos con un papel tóxico en la célula debido a las alteraciones en transporte axonal y degeneración que las células presentan.

Por otro lado, también se le han atribuido propiedades tipo prion a la proteína tau, ya que estudios experimentales con extractos de proteína tau humana con la mutación P301S extraídos de ratones transgénicos, inyectados en animales que expresaban proteína tau humana sin modificar, promovieron el ensamblaje de esta proteína tau no mutada, causando la aparición de la patología tanto en la zona de inyección como en las zonas colindantes (Clavaguera et al., 2009).

1.4 Tratamientos

Además de la aparición de las ya descritas placas amiloides y los ovillos neurofibrilares, la EA se caracteriza por la alteración en los niveles de diversos neurotransmisores que conllevan muerte celular. La neurotransmisión glutamatérgica y la colinérgica son las que se encuentran mayormente afectadas, lo que se relaciona directamente con los síntomas de la enfermedad a nivel de aprendizaje y memoria. Las neuronas glutamatérgicas localizadas en la amígdala, la formación reticular, el hipocampo y la corteza cerebral, están conectadas con neuronas colinérgicas localizadas en el septum medial, la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert. Estas neuronas colinérgicas inervan a su vez la isocorteza y el hipocampo.

En general, los tratamientos disponibles para la EA hasta la fecha, no han conseguido frenar la progresión de la enfermedad. Solo permiten tratar los síntomas asociados y alargar el tiempo hasta el momento en el que inevitablemente, los pacientes se vuelven dependientes. A continuación se exponen dos aproximaciones.

1.4.1 Farmacológicos

Actualmente, debido a que los mecanismos moleculares específicos de la enfermedad aún están siendo investigados, los tratamientos farmacológicos aprobados están basados en compensar las deficiencias en neurotransmisores presentes en la enfermedad, aunque ninguno de ellos detiene el progreso natural de la misma.

En la EA hay una alteración en la actividad de dos enzimas relacionadas con el neurotransmisor acetilcolina (ACh), la acetilcolinesterasa, que cataliza la hidrólisis de la ACh en colina y ácido acético, finalizando así la neurotransmisión, y la acetiltransferasa (ChAT), que cataliza la transferencia de un grupo metil a la amina colina para formar el neurotransmisor. Debido a esto, durante el transcurso de la enfermedad hay una disminución de neuronas colinérgicas, hecho que llevó a formular la “hipótesis colinérgica”, que como se ha mencionado anteriormente, se postula que la pérdida de esta población neuronal es la causante de los síntomas. Un incremento en los niveles de este neurotransmisor compensará esta pérdida, lo que se consigue con algunos fármacos como el donepezilo, la galantamina y la rivastigmina, que actúan como inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa, y son utilizados en fases de demencia leve y moderada (Parsons et al., 2013). La tacrina fue utilizada durante muchos años pero debido a su toxicidad hepática y otros efectos secundarios, se dejó de utilizar (Hong-Qi et al., 2012).

También podemos encontrar otro tipo de fármacos que actúan sobre el sistema glutamatérgico. El neurotransmisor glutamato es responsable de la mayoría de la neurotransmisión excitadora del SNC, particularmente en la corteza cerebral y el hipocampo (Danysz et al., 2000). En condiciones normales, cuando el glutamato activa su receptor NMDA (del inglés *N-methyl-D-aspartate*), hay un flujo de iones de calcio hacia la neurona post-sináptica. Esto induce una cascada de señalización que produce plasticidad sináptica. En la EA, el receptor está sobreactivado, produciendo un flujo

constante de iones calcio, creando un ruido de fondo en el que las señalizaciones fisiológicas quedan escondidas y no son detectadas (Cacabelos et al., 1999, Danysz and Parsons, 2003). Un ejemplo de fármaco capaz de actuar en este sistema es la memantina. Este medicamento, sintetizado por primera vez por la farmacéutica *Eli Lilly*, bloquea los receptores de NMDA de glutamato, reduciendo así el ruido de fondo y por tanto la sobreestimulación que resulta en neurotoxicidad. Este tratamiento se utiliza en fases en que la enfermedad es moderada y/o severa (Parsons et al., 2013).

1.4.2 Alternativos: el uso de anticuerpos y péptidos

En cualquier caso, cualquiera de los fármacos anteriormente mencionados, se utilizan meramente como tratamiento paliativo, ya que no curan ni detienen el avance de la enfermedad. Además, solo funcionan en un porcentaje de los enfermos (Citron, 2010). Por ello, se han desarrollado tratamientos alternativos como los que se mencionan a continuación.

Inmunoterapia

Hay dos tipos de inmunizaciones, la activa y la pasiva. La inmunización activa se basa en la potenciación de la respuesta humoral del sistema inmune del propio organismo para la formación de anticuerpos. De esta manera se puede generar una memoria inmunitaria con la consecuente producción de anticuerpos contra el antígeno administrado. En este sistema se basan la mayoría de vacunas administradas a lo largo de nuestra vida. La inmunización pasiva, en cambio, se basa en la administración directa de anticuerpos para generar una respuesta rápida (revisado en (Wisniewski and Goni, 2014)).

En las últimas décadas se han desarrollado inmunoterapias focalizadas en la hipótesis del péptido amiloide. En esta línea, se han llevado a cabo inmunizaciones activas y pasivas con el objetivo de reducir el depósito de A β . Debido al éxito obtenido mediante el uso de modelos animales, se han llegado a realizar ensayos clínicos usando estos tratamientos.

En modelos animales de la EA, se observó que la inmunoterapia con anticuerpos anti-A β inhibía la fibrilación del péptido además de disgregar las fibras ya formadas, evitando así la toxicidad mediada por A β (Solomon et al., 1997). Esto llevó a varios grupos a realizar inmunizaciones activas usando el péptido A β_{42} en estado agregado junto con el adyuvante de Freund, en los que se obtuvo una reducción de depósito de A β y del daño cognitivo (Janus et al., 2000, Sigurdsson et al., 2001). Resultados similares se obtuvieron mediante inmunización pasiva usando anticuerpos monoclonales anti-A β (Bard et al., 2000, DeMattos et al., 2001). En estos ensayos realizados con animales no se vieron síntomas de toxicidad derivada de la vacuna, pero para ganar seguridad, se propuso el uso de péptidos homólogos que desencadenaran una respuesta humoral de tipo Th2, teniendo en cuenta que los epítopos mayoritarios para células B se encuentran en los primeros 15 aminoácidos de la molécula.

Debido a los resultados obtenidos en animales en fases preclínicas, en el año 2000 empezó un ensayo clínico en fase I en el Reino Unido con una vacuna llamada AN1792, para testar la antigenicidad y la toxicidad. Esta vacuna consistía en la inmunización del péptido A β_{42} entero pre-agregado junto con el adyuvante QS21, debido a que el adyuvante de Freund no se puede usar en humanos. Este adyuvante, extraído de la corteza del árbol quillay (*Quillaja saponaria*) endémico de Chile, es un gran potenciador de la respuesta inmune. En esta primera fase se obtuvo respuesta humoral en un 53% de los pacientes. Para la siguiente fase, a este adyuvante se le añadió también otro componente para mejorar la solubilidad del péptido agregado llamado polisorbato 80, un

excipiente hoy en día utilizado en algunas vacunas y en cosmética. El resultado fue la aparición de síntomas correspondientes a meningoencefalitis en un 6% de los pacientes, que llevó a la finalización del ensayo (Gilman et al., 2005, Pride et al., 2008). Autopsias realizadas a algunos de los pacientes participantes del ensayo clínico revelaron una disminución de placas en áreas corticales del cerebro que parecía involucrar a la microglía en un proceso de fagocitosis. Sin embargo, los depósitos asociados a vasos o la taupatía no se vieron afectados, y las mejoras cognitivas eran muy leves (Nicoll et al., 2003).

Desde esta primera aproximación, se han realizados otros ensayos clínicos con péptidos mejorados, como por ejemplo el utilizado en una vacuna llamada CAD106 desarrollada por Novartis Pharmaceuticals, en la que el péptido usado era un fragmento de 6 aminoácidos de la zona correspondiente a los epítomos específicos de células B (Winblad et al., 2012). Otro ejemplo es la ACC-001 de Pfizer basado en el mismo péptido, pero también se han desarrollado péptidos miméticos al original, reduciendo así el riesgo de una reacción cruzada con otro antígeno (Ryan and Grundman, 2009). El problema que presenta este tipo de inmunoterapia es que, aunque se logra reducir el número de placas en la corteza cerebral, los ovillos neurofibrilares de tau permanecen intactos, llevando a una poca mejoría de los signos clínicos.

Uno de los mayores riesgos que puede haber al utilizar la inmunización activa, es la sobreestimulación de la respuesta inmune, especialmente del tipo Th1. Por ello se ha desarrollado, como alternativa, la transferencia directa de anticuerpos prefabricados contra el antígeno deseado. Actualmente disponemos de mucha información acerca de las diferentes especies tóxicas que se producen durante la agregación del péptido A β , y eso ha permitido desarrollar anticuerpos específicos para su estudio en el laboratorio y poder caracterizarlos mejor.

El problema más evidente de este tipo de inmunización, es la necesidad de administrar repetidas dosis, puesto que la respuesta no es sostenida y no se genera memoria inmune como en el caso anterior. También hay que tener la certeza de que el anticuerpo reconozca específicamente al antígeno sin el peligro que se pueda desarrollar una respuesta autoinmune. Además, en la EA, el anticuerpo tiene que penetrar la barrera hematoencefálica (BHE).

Estudios realizados con modelos transgénicos de la enfermedad mostraron una reducción de A β así como una mejora cognitiva con este tipo de aproximaciones (Bard et al., 2000, DeMattos et al., 2001). El mecanismo de acción de estos anticuerpos para eliminar el depósito de A β no se conoce exactamente, pero se cree que los anticuerpos podrían secuestrar el péptido soluble evitando así su agregación e incluso provocar la disgregación de los depósitos, así como también activar la fagocitosis realizada por la microglía.

Algunos ejemplos de ensayos clínicos que han superado la tercera fase, como el Bapineuzumab u otros anticuerpos humanizados, que reconocen una región específica del péptido A β , no consiguieron producir una mejor clínica en los sujetos, aunque el Solanezumab si consiguió una mejora en los pacientes en la fase más temprana de la enfermedad (Farlow and Brosch, 2013). Este hecho probablemente indicaría que, si el tratamiento se realizara en fases más tempranas, donde se evitara desde el inicio el depósito de A β , impidiendo así la cascada de señalización subsecuente que causaría la taupatía, se conseguiría frenar o incluso evitar el desarrollo de la enfermedad, siempre que la presencia de anticuerpos fuera sostenida. Además, estas aproximaciones realizadas mediante inmunización pasiva tienen el inconveniente de que el antígeno diana no es la forma oligomérica de A β específicamente, sino el péptido en su

conformación estándar. Eso puede repercutir en las funciones fisiológicas de su precursor, así como aumentar el riesgo de reacciones autoinmunes.

Debido a la falta de recursos actuales para detectar la enfermedad a muy temprana edad, una doble terapia englobando tanto el depósito de A β como la taupatía sería una buena alternativa, puesto que hay estudios que muestran como el estado de la taupatía se correlaciona mejor con el grado de demencia (Arriagada et al., 1992, Terry, 1996). Ensayos realizados con animales transgénicos de sobreexpresión de la forma mutada de tau P301L mediante un péptido fosforilado de tau en ser396 y ser404, mostraron una reducción de la proteína tau agregada y una mejora en sus funciones motoras (Asuni et al., 2007), pero el uso de epítomos de tau para realizar la inmunoterapia activa podría provocar el desarrollo de encefalitis incluso si el epítomo está fosforilado (Rosenmann et al., 2006). En el caso de tau, los anticuerpos podrían ser una aproximación más segura si son capaces de cruzar la BHE y ser captados por las neuronas. También es posible que, debido a las evidencias de que tau se podría comportar como una partícula priónica, estos anticuerpos podrían actuar secuestrando estas partículas y evitando así la propagación de la patología.

Otra alternativa podría ser el uso de la conformación o la estructura de la molécula para la inmunización. Tanto en el caso del péptido A β como en el de tau, las formas oligoméricas parecen ser las conformaciones más tóxicas, y se caracterizan por un elevado contenido de hojas beta, de modo que una misma terapia estaría enfocada a las dos patologías. Además, esto aumentaría la seguridad de la terapia puesto que las funciones fisiológicas de las dos proteínas no se verían afectadas (revisado en (Wisniewski and Goni, 2014)). De hecho, en estrategias donde se ha bloqueado la conformación oligomérica del péptido A β , se han obtenido mejoras cognitivas. En el laboratorio de Wisniewski, han realizado este tipo de aproximación usando un péptido con elevado contenido de hojas beta en forma oligomérica, y han obtenido tanto una disminución de las dos patologías, así como una mejora cognitiva en los animales triple transgénicos del tipo 3xTg (Goni et al., 2013).

En cualquier caso, para usar este tipo de terapias hay que tener muy en cuenta en qué estadio de la enfermedad podemos administrarla para obtener beneficios.

Inhibidores de β -secretasa

Una de las dianas más prometedoras en el tratamiento de la enfermedad es la β -secretasa. El descubrimiento de que una mutación en APP que inhibía el procesamiento mediado por BACE podría ser protectora frente la EA, catapultó la investigación hacia los inhibidores de BACE (Jonsson et al., 2012). Esta enzima es una de las responsables de cortar APP, participando en la generación del péptido A β (ver apartado 1.2.2). En condiciones fisiológicas, se cree que puede tener un papel importante en la sinapsis, puesto que se encuentra concentrada en los terminales presinápticos (Kandalepas et al., 2013). De hecho, aunque estudios iniciales con animales KO para BACE1 no mostraron alteraciones fenotípicas respecto a los *wild type*, a parte de una menor producción de A β , estudios más recientes han demostrado que estos animales KO muestran defectos en guía axonal (Rajapaksha et al., 2011, Hitt et al., 2012), hipomielinización (Willem et al., 2006, Hu et al., 2008b), y defectos de memoria (Kobayashi et al., 2008), entre otros. La inhibición de BACE1 puede afectar entonces, además de a la condición patológica de la enfermedad, a sus funciones fisiológicas.

Existe otra β -secretasa, BACE2, que se expresa de forma predominante en el páncreas (Bennett et al., 2000, Esterhazy et al., 2011), y presenta una homología del 64% con BACE1. Estudios hechos

con animales KO para BACE1, cruzados con animales transgénicos para APP, demuestran que BACE2 no ejerce una función compensatoria de las funciones de BACE1, en cuanto a producción de A β se refiere, cuando BACE1 no se expresa, puesto que los animales no presentaban placas (Luo et al., 2003, Ohno et al., 2004, McConlogue et al., 2007).

La inhibición de BACE1 a nivel terapéutico conlleva conocer la respuesta a diferentes preguntas como por ejemplo cual sería el nivel óptimo de inhibición necesario para que el tratamiento sea eficaz. En pacientes con EA, los niveles de BACE1 son prácticamente el doble con respecto a una persona sana (Fukumoto et al., 2002, Yang et al., 2003). Además, en animales heterocigotos para BACE1 cruzados con animales transgénicos para APP, con un 50% de la carga genética de la proteína, presentan una reducción del 20% de la producción de A β (McConlogue et al., 2007).

Otro aspecto a tener en cuenta es que a medida que avanza la enfermedad, la cantidad de A β presente es mayor, de modo que según el estadio en el que se encuentre el paciente, esta inhibición tendría que ser mayor o menor. El momento en el que se inicie el tratamiento también es de vital importancia para conseguir efectos óptimos que podrán ser sostenidos con un tratamiento crónico, para retrasar el inicio o el avance de la enfermedad.

En la actualidad, se están llevando a cabo varios ensayos clínicos testando inhibidores de BACE1. Los inhibidores de primera generación eran de tipo peptídico mimetizando el sitio de corte de la β -secretasa, pero se ha demostrado que no son buenos candidatos, puesto que no tienen las propiedades óptimas para serlo, como buena biodisponibilidad oral, penetración de la BHE, entre otros. Eso ha llevado al diseño de inhibidores no peptídicos con el propósito de mejorar estas propiedades (revisado en (Yan and Vassar, 2014)).

Actualmente, inhibidores de tercera generación han sido desarrollados, y presentan una buena penetración de la BHE y una buena farmacocinética, así como una buena reducción de A β en estudios con animales (Probst and Xu, 2012). Eso ha llevado al inicio de ensayos clínicos con algunos de estos inhibidores como el MK-8931, que ya ha pasado las primeras fases siendo bien tolerado sin efectos adversos destacables y obteniendo una reducción significativa de la concentración de A β en el líquido cefalorraquídeo (LCR) dependiente de dosis (Forman et al., Forman et al.). Actualmente está en fase 3. Otro ejemplo es el LY2886721 (May et al.), inhibidor no peptídico que llegó a fase 2 pero el ensayo fue suspendido debido a una disfunción del hígado presentada en algunos pacientes, aunque no parece ser un efecto derivado de la inhibición de BACE1 directamente.

Inhibidores de γ -secretasa

γ -secretasa es una proteasa con una elevada heterogeneidad y complejidad. Respecto a su sustrato, corta APP pero también otras proteínas transmembranas de tipo I en sus dominios transmembrana (De Strooper, 2003). Otro elemento que la hace compleja, es su composición. Las presenilinas 1 y 2 forman el centro catalítico aunque son necesarias otras 3 proteínas accesorias para una función completa que parecen estar involucradas en la maduración y la estabilidad del complejo (ver apartado 1.2.2).

En humanos se han identificado hasta 6 complejos funcionales diferentes de γ -secretasa (Hebert et al., 2004), y mediante deleciones específicas de genes relacionados con las proteínas que forman el complejo, se ha demostrado que algunos participan en la vía de señalización de Notch, llevando a un fenotipo de muerte embrionaria, dificultando la tarea de encontrar un buen

inhibidor. De modo que la inhibición del complejo adecuado sería una buena alternativa a una inhibición inespecífica (Serneels et al., 2009).

Diversos inhibidores de γ -secretasa se han probado en modelos animales. En estos estudios se ha visto una disminución en el depósito de A β (Abramowski et al., 2008, Bateman et al., 2009), pero una inhibición inespecífica conlleva una elevada toxicidad relacionada con una inhibición de la vía de Notch, importante durante el desarrollo. Actualmente algunos inhibidores de γ -secretasa están siendo evaluados en ensayos clínicos. Un ejemplo es el LY450139, un inhibidor no selectivo que está en fase III, mostrando hasta la fecha, una disminución de los niveles de A β en el LCR en controles (Bateman et al., 2009).

Como se ha dicho anteriormente, este tipo de inhibidores pueden estar relacionados con toxicidad debido a la heterogeneidad del complejo. Por ese motivo, se están desarrollando compuestos que no afecten a la vía de Notch, aunque su mecanismo de acción no está del todo claro. Algunos están siendo probados en ensayos clínicos (De Strooper et al., 2010).

La inhibición de γ -secretasa también podría afectar a la producción de metabolitos intracelulares liberados durante el procesamiento de sus sustratos, como el péptido AICD, que participa en eventos de señalización intracelular. Por este motivo, se han desarrollado compuestos capaces de modular la actividad γ -secretasa, permitiendo alterar la producción de los péptidos de A β , sin inhibir su actividad (Kukar and Golde, 2008). La disminución de la producción de A β conlleva el aumento de producción de péptidos más cortos, y podría ser una buena alternativa terapéutica. Tarenflurbil es el primer modulador testado en humanos, y demostró ser seguro durante los primeros ensayos clínicos pero una vez en fase III, los pacientes tratados con el modulador no mostraron mejoras cognitivas con respecto al grupo control (Green et al., 2009).

Inhibidores de α -secretasa

En condiciones fisiológicas, APP es procesado por α -secretasa preferentemente, una actividad que está mediada por un conjunto de proteasas de la familia ADAM. Este procesamiento se realiza por un punto que se encuentra dentro del dominio A β de la proteína, impidiendo así su formación (ver apartado 1.2.1). Consecuentemente, un aumento de esta actividad conllevaría un efecto protector en la EA ya que no se podría producir el péptido A β . Esto ha sido mostrado en varios estudios en los que se obtuvo una menor actividad β -secretasa y una reducción de la producción de A β (Skovronsky et al., 2000), aunque estos resultados no han podido ser replicados por otros laboratorios (Rossner et al., 2000).

Un problema añadido es la variedad de proteasas con actividad α -secretasa. Para conseguir un buen resultado hace falta conocer la contribución de cada miembro de esta familia a este proceso, para saber cuál es el objetivo principal y si existe compensación por parte de los otros miembros para poder establecer un buen tratamiento. Por este motivo, se han desarrollado tratamientos que estimulan de forma indirecta la α -secretasa (revisado en (De Strooper et al., 2010)).

Inhibidores de la agregación de A β

Recientemente, formas agregadas del péptido A β llamados oligómeros han cobrado protagonismo como los principales promotores de la toxicidad que ocurre en la enfermedad. Inhibir su capacidad de agregación podría ser una buena alternativa terapéutica. Un ejemplo es el llamado *Alzhemed*, también conocido como "homotaurina", por ser una variante de este aminoácido. Su mecanismo de acción se basa en unirse a moléculas solubles de A β para inhibir la formación de agregados mediante la interacción de A β con glicosaminoglicanos endógenos, implicados en la agregación del

péptido y la estabilidad de las placas (Gupta-Bansal et al., 1995). En estudios con animales, se vio una inhibición de la agregación del péptido (Gervais et al., 2001, Gervais et al., 2007), así como una reducción de las placas amiloides (Gervais et al., 2007). En ensayos clínicos se obtuvieron buenos resultados en cuanto a tolerabilidad y penetración de la BHE, pero en ensayos de fase III no se obtuvieron mejoras cognitivas respecto al grupo control (Aisen et al., 2007).

Un problema generalizado en la EA, es que la mayoría de estos ensayos clínicos mencionados anteriormente, se prueban en pacientes con EA leve a moderado. Eso significa que se aprecian cambios cognitivos que son el resultado de daños permanentes en poblaciones neuronales de la corteza y el hipocampo. Estas aproximaciones anteriormente mencionadas conseguirían frenar el avance de la enfermedad. Un buen y muy precoz diagnóstico de la enfermedad permitiría aplicar el tratamiento cuando los síntomas son casi inapreciables.

Tratamientos basados en la patología de tau

Tal y como se ha comentado en el apartado 1.2.3, tau es una proteína que está altamente fosforilada en la enfermedad. Esta fosforilación está controlada por la acción de diferentes cinasas y fosfatasas, de modo que inhibir una de las cinasas, o una combinación de ellas, sería una buena estrategia. No obstante, no existe un consenso referente a cuál sería la mejor cinasa a inhibir. Algunos de los candidatos son CDK5 o GSK3 β (revisado en (Citron, 2010)).

1.5 Modelos experimentales de la EA

1.5.1 *In vitro*: Toxicidad del β -amiloide en cultivo neuronal

La hipótesis de la cascada amiloide ha sido la pieza central en la investigación de la EA desde su formulación (Hardy, 2009). En esta hipótesis se postula que son las fibras de A β , que se pueden encontrar en las placas seniles, las responsables de la elevada muerte neuronal causante de la demencia característica de la enfermedad. Al inicio de los años 90, se demostró su toxicidad en neuronas mediante soluciones que contenían péptido A β sintético (Busciglio et al., 1992, Pike et al., 1993). Esta toxicidad requería, además, una reorganización peptídica que solo ocurría en las soluciones que habían estado almacenadas un tiempo, puesto que las “frescas” que solo contenían unidades monoméricas, eran inocuas (Loo et al., 1993, Lorenzo and Yankner, 1994). Las formas agregadas que se encontraron eran similares a los agregados fibrilares presentes en las placas seniles. Este hecho daba más fundamento a la hipótesis amiloide, pero el problema subyacente de ésta era la falta de correlación entre el daño neuronal y la demencia con la localización y número de placas presentes en los cerebros enfermos (Klein, 2002).

Esta falta de correlación obtuvo su respuesta cuando al final de los 90, se identificaron unos agregados solubles del péptido A β que no tenían estructura fibrilar, sino una estructura globular. Son los llamados oligómeros o ADDLs (del inglés *Amyloid-Derived Diffusible Ligands*) (Lambert et al., 1998), y se identificaron en extractos de cerebro de animales transgénicos así como en pacientes de EA. Estos oligómeros actuarían como neurotoxinas mucho antes de que se desarrollaran los primeros síntomas de la enfermedad.

A nivel experimental, los primeros estudios en los que se demostró que la neurotoxicidad mediada por A β no requería la presencia de formas fibrilares fueron a mediados de los 90 mediante preparaciones de ADDLs tratados con ApoJ, una proteína secretada por células gliales que bloqueaba la formación de agregados de mayor tamaño sin que eso afectara a su toxicidad, sino

que más bien la aumentaba. Estas preparaciones de ADDLs causaban toxicidad en concentraciones nanomolares y relativamente rápido, siendo las neuronas corticales diferenciadas las más sensibles a su toxicidad (Oda et al., 1995).

Los ADDLs también inhibían un tipo de plasticidad sináptica llamada potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*), usado para estudiar aprendizaje y memoria, reforzando en cambio la LTD, *long term depression* (Wang et al., 2002). Esta inhibición se ha visto tanto en cortes de cerebro como *in vivo*, así como mediante el uso del estereotáxico para introducir ADDLs directamente en las sinapsis, y participaría, a largo plazo, en la pérdida sináptica. Los ADDLs también inducen muerte neuronal, pero no de forma inespecífica sino de forma selectiva, siendo las neuronas del hipocampo las más susceptibles a estos mientras que no hay muerte en neuronas cerebelares. Esta especificidad no se ha observado en los agregados fibrilares (Klein, 2002).

La forma de obtener estas soluciones de ADDLs sin aparición de agregados fibrilares está descrita en la bibliografía a partir de péptido A β sintético y bajo condiciones específicas de tiempo y temperatura (Klein, 2002, Stine et al., 2003). Son relativamente estables y no presentan otros tipos de agregados de mayor tamaño, aunque la población de oligómeros es heterogénea de por sí. Los ADDLs también han sido detectados en extractos solubles de cerebros humanos. Estudios preliminares indicaron que los oligómeros presentes en estas muestras eran equivalentes a las especies sintéticas utilizadas experimentalmente. El tamaño de oligómero típico en un cerebro de EA es de 12-mer (Klein, 2002).

Des de la identificación de estos oligómeros, muchos han sido los estudios publicados con el objetivo de identificar la existencia de posibles receptores y descubrir todos los pasos moleculares que unen a estos con la patología de tau, así como el origen de su toxicidad. Al inicio del año 2000, el grupo de Klein et al., ya proponía que los ADDLs debían mediar sus efectos neurotóxicos mediante la interacción con diferentes receptores. Algunos de estos posibles receptores que se unen a ADDLs son p140, p260, que no están en el cerebelo (Klein, 2002), y PrP^C (Lauren et al., 2009). El uso de preparaciones sintéticas de ADDLs, validadas en cuanto a semejanza con los oligómeros encontrados en cerebros de pacientes, son un buen modelo para el estudio de los eventos moleculares que dan lugar a la patofisiología característica de la enfermedad.

Varios estudios demuestran que los ADDLs tienen un impacto en vías de señalización relacionadas con fyn, una proteína tirosina cinasa de la familia Src, importante en procesos de memoria y sinapsis., aunque También es importante para la EA, puesto que se ha visto una sobreexpresión de fyn en neuronas que contienen ovillos neurofibrilares (Shirazi and Wood, 1993). La activación de fyn también puede estimular la fosforilación de tau mediada por GSK3 β . Fyn también actuaría corriente arriba en cascadas de señalización que dan lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS), y los ADDLs intervienen en la formación de ROS en líneas neuronales (Longo et al., 2000). Además, las preparaciones de amiloide que estimulan la fosforilación de tau, también activan fyn. En cultivos procedentes de ratones KO para fyn, los ADDLs no inducen muerte. fyn se encuentra normalmente en la densidad postsináptica asociada a PSD-95 (Lambert et al., 1998).

Muchos estudios han utilizado, entonces, tanto péptidos sintéticos de A β (Wang et al., 2004) como aislados de líneas celulares transfectadas (Walsh and Selkoe, 2007), o purificados de cerebros de pacientes de EA (Shankar et al., 2008), para estimular diferentes modelos y líneas celulares y crear así un modelo *in vitro*. Sin embargo, estos modelos *in vitro* muestran varias limitaciones, ya que los diferentes grupos han descrito una gran diversidad de resultados, y los oligómeros de A β de

diferentes fuentes pueden no comportarse de igual modo. Una alternativa o un complemento necesario es el uso de modelos animales.

1.5.2 *In vivo*: Modelos animales.

Los cultivos *in vitro* proporcionan un buen modelo para el estudio de los cambios moleculares acontecidos en las neuronas tras el tratamiento con oligómeros de A β , pero para el estudio del impacto que estos tienen en el cerebro es necesario utilizar un modelo más complejo y próximo a la situación real. En ese sentido, los modelos animales proporcionan una buena simulación de ciertos parámetros detectables en la enfermedad, tanto a nivel molecular como a nivel cognitivo y de comportamiento, obteniendo una visión más global y conjunta de todo el proceso.

El ratón, *Mus musculus*, fue uno de los primeros organismos en los que la tecnología de crear animales transgénicos estuvo disponible. Ofrece un gran número de ventajas en la investigación puesto que son pequeños y fáciles de manejar, tienen una progenie abundante, la gestación es muy corta (19 días), y su genoma ha sido completamente mapado. Además, presenta una alta homología con el genoma humano, lo que lo convierte en un perfecto candidato para el estudio de enfermedades humanas (Waterston et al., 2002).

Sin embargo, los ratones no son los únicos modelos utilizados. En los últimos 15 años, los invertebrados han ido ganando terreno en la modelización de enfermedades neurodegenerativas humanas. Algunos de los modelos más utilizados han sido *Drosophila melanogaster*, y *Caenorhabditis elegans* (Lu and Vogel, 2009, Dimitriadi and Hart, 2010, Wentzell and Kretzschmar, 2010). Estos modelos aportan diversas ventajas respecto a otros como los ratones, como es la facilidad y bajo coste de mantenimiento que implican, la elevada descendencia y su corto periodo de vida, especialmente importante en enfermedades relacionadas con la edad.

A continuación se describirán en detalle estos modelos, especialmente el ratón por ser el utilizado en nuestro grupo de investigación.

El ratón como modelo experimental de la EA

Las mutaciones genéticas juegan un papel importante en la aparición de la EA, y la estrategia de generar animales transgénicos o *knockout* que reproduzcan las mutaciones conocidas nos proporcionan una herramienta básica para su estudio. Actualmente, existe una gran variedad de modelos de ratón para su uso en la investigación de la EA basados en las formas hereditarias de esta. Concretamente, mutaciones en los genes que codifican para las proteínas APP, PSEN1 y PSEN2 que causan la aparición de la EA autosómica dominante, la cual mantiene una alta similitud con los casos esporádicos, han servido de base para desarrollar la mayoría de modelos de la enfermedad (Hall and Roberson, 2012). Respecto al gen APP, algunas de estas mutaciones, ya mencionadas en el apartado 1.1.5 son la *Swedish*, *London*, *Dutch*, y *Artic*. En cambio, para las presenilinas, las mutaciones en *PSEN1* son más utilizadas en la generación de modelos debido a que son también más severas y comunes.

Además de las mutaciones anteriores, un incremento en el número de copias del gen APP puede causar EA. La duplicación del gen ha resultado en aparición temprana de la enfermedad en varias familias (Cabrejo et al., 2006). Este también es el caso de pacientes con SD o trisomía del cromosoma 21, que tienen, la mayoría de ellos, 3 copias del gen APP. Eso indica que otro modelo se puede obtener sobreexpresando esta proteína sin depender de las mutaciones genéticas. Con este pretexto se realizaron los primeros modelos de EA, sobreexpresando la secuencia humana

completa de APP (Buxbaum et al., 1993) o el fragmento A β (Wirak et al., 1991), pero aunque había una buena expresión de la proteína en el cerebro de los animales, no mostraban depósito de A β .

A pesar de la gran cantidad de trabajos realizados con este modelo, cabe destacar que ninguno de ellos muestra todos los rasgos distintivos de la EA (Chen, 2013). Por ejemplo, ninguno de los modelos utilizados hoy por hoy, muestra una excesiva pérdida neuronal como ocurre en pacientes, probablemente porque el tiempo de desarrollo de la enfermedad es muy inferior. La mayoría de los modelos muestran un deterioro cognitivo y placas amiloides, mientras que los ovillos de tau solo suelen aparecer cuando se expresa la proteína tau humana (Hall and Roberson, 2012). Entonces, los modelos pueden ser útiles para desentrañar los mecanismos moleculares que participan antes y durante el desarrollo de la enfermedad pero es un hecho a tener en cuenta cuando se realizan estudios de fármacos en fases preclínicas.

Usando otro tipo de modificación genética, la supresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis, ha ayudado a estudiar los efectos que pueden tener algunos tratamientos utilizados en la EA que consisten en la inhibición de estas proteínas. Es el caso de los animales KO. Existen modelos KO para proteínas como APP, BACE, PSEN1, PSEN2, ADAM10, tau (Luo et al., 1992, Shen et al., 1997, Herreman et al., 1999).

A modo de resumen, podemos clasificar los diferentes modelos de ratón experimentales de la EA según la estrategia que se ha seguido para crearlos (revisado en Saraceno et al 2013):

Expresión de APP humana (hAPP): en general este tipo de modelos desarrollan una patología amiloide y presentan déficits de memoria, aunque no una pérdida significativa de neuronas. Las diferencias entre los distintos modelos se basan en el promotor elegido para sobreexpresar APP (como Thy1 o PrP), la isoforma de la proteína a expresar (APP695, APP51, APP770) y las mutaciones que presentará, siendo la mutación *Swedish* la más común, así como el fondo genético del animal (C57BL/6 o 129 son los más utilizados).

- ✓ PDAPP: desarrollado en 1995 por el laboratorio de F. Gillespi (Games et al., 1995), fue el primer ratón transgénico capaz de desarrollar un fenotipo robusto relacionado con la EA. Sobreexpresa la proteína APP humana con la mutación *Indiana* bajo el control del promotor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- β , del inglés *platelet derived growth factor- β*) haciendo que su expresión esté confinada preferentemente a neuronas de la corteza, hipocampo, hipotálamo, y cerebelo. Como características neuropatológicas mostraba el depósito de A β en placas difusas y neuríticas, CAA, astrocitosis, microgliosis, atrofia del hipocampo, alteraciones sinápticas y de comportamiento (Dodart et al., 1999).
- ✓ Tg2576: en 1996, una segunda línea fue creada (Hsiao et al., 1996). Este modelo sobreexpresa la isoforma APP695 que contiene la mutación *Swedish*, bajo el promotor de PrP de hámster, y presenta un fondo genético mixto B6;SJL. A los 11-13 meses presenta un incremento de los niveles de A β_{42} asociado al desarrollo de placas en la corteza, hipocampo, corteza entorrinal, presubiculo, subiculo y cerebelo (Hsiao et al., 1996). No hay evidencias de ovillos neurofibrilares. A los 9-10 meses de edad presenta déficits de memoria que correlacionan con la formación de las placas y con cambios en la plasticidad sináptica (Chapman et al., 1999).
- ✓ APP23: expresa la isoforma APP751 y contiene la mutación *Swedish* bajo el promotor Thy1.2. Se observan depósitos de A β a los 6 meses de edad (Sturchler-Pierrat et al., 1997), y presenta CAA (Winkler et al., 2002), con placas que incrementan en número y tamaño con la edad. Se

detectan déficits de memoria espacial a los 3 y 6 meses de edad sin mostrar placas (Van Dam et al., 2003).

- ✓ J20: expresa hAPP, concretamente la isoforma APP770 con las mutaciones *Swedish* y *Indiana* (V717F) bajo el promotor PDGF- β . Muestran un aumento del depósito de A β en el hipocampo entre las 6 y las 36 semanas, y desarrollan las placas a los 5-7 meses de edad (Mucke et al., 2000). Los defectos de memoria y aprendizaje dependen de la edad y aparecen a los 4 meses (Wright et al., 2013).

Dobles transgénicos (hAPP/presenilina): respecto a las presenilinas, la mayoría de modelos se basan en mutaciones en el gen de la *PSEN1*. Éstas son las mutaciones mayoritarias respecto a *PSEN2* y son, además, más severas. Se pueden encontrar de forma individual, o en combinación con otras mutaciones en estos genes (Hall and Roberson, 2012). Por otra parte, la expresión de hAPP parece ser necesaria para que los ratones desarrollen la enfermedad, debido a las diferencias en la secuencia entre las proteínas APP humana y la de ratón, las cuales están localizadas en la región A β . Las líneas más utilizadas hoy en día se obtuvieron co-inyectando los transgenes correspondientes a hAPP y presenilina para que fueran como un único transgen, o bien cruzando dos líneas con una mutación cada una.

Algunos ejemplos de este tipo de líneas son:

- ✓ APP_{swe}/PSEN1 Δ E9: creado por el laboratorio de Borchelt D, combina la sobreexpresión de hAPP con la mutación *Swedish*, y PSEN1 con una delección en el exón 9, bajo el promotor de PrP. Estos ratones desarrollan placas amiloides y síntomas de deterioro cognitivo sobre los 4-6 meses de edad, con un abundante número de placas a los 9 meses, que va incrementando hasta los 12 (Jankowsky et al., 2001, Jankowsky et al., 2004, Garcia-Alloza et al., 2006).
- ✓ 5XFAD: creado por la combinación de 5 mutaciones relacionadas con la EA en dos transgenes, hAPP con las mutaciones *Swedish*, *Florida*, y *London*, y otras dos en *PSEN1*, la M146L y la L286V, bajo el promotor Thy1. Este modelo expresa una elevada cantidad de A β 42 que empieza a acumularse entre los primeros dos meses, y se esparcen por todo el hipocampo y la corteza sobre los 6 meses de edad. A los 4 meses de edad, se puede observar degeneración sináptica así como pérdida neuronal y déficits de memoria espacial (Oakley et al., 2006). No presenta ovillos neurofibrilares y la LTP presenta un deterioro a los 6 meses de edad (Kimura and Ohno, 2009).
- ✓ 2xKI: es un ratón doble *knock-in* que expresa la mutación *Swedish*, y una secuencia humanizada de A β , mientras que en el caso de las presenilinas presentan la mutación P264L asociada a EA familiar. Una de las ventajas que presenta este ratón es que no sobreexpresa APP, pero por el contrario, no se obtienen controles de la misma camada por el mantenimiento de los ratones en homocigosis (Hall and Roberson, 2012).

Modelos de la fisiopatología mediada por tau: Las líneas anteriormente mencionadas son un buen modelo de la patología A β , pero no de la de tau. Para intentar reproducir esta parte de la enfermedad, se han desarrollado modelos que expresan tau humana con mutaciones que causan demencia frontotemporal (DFT, o FTD del inglés *frontotemporal dementia*), pero se desconoce si estas están involucradas con la fisiopatología de la EA. En consecuencia, modelos que únicamente estén basados en estas mutaciones se consideran modelos de DFT, por lo que se han desarrollado modelos doble transgénicos con mutaciones en *APP* y en el gen que codifica para tau para la experimentación con EA. Algunos ejemplos son:

- ✓ TAPP: producido a partir del cruce entre las líneas Tg2576 y la JNPL3 que expresa tau humana (htau) con la mutación P301L bajo el promotor de PrP de ratón. Esta mutación es la más comúnmente asociada a la DFT y favorece la agregación de tau (Hall and Roberson, 2012). Aunque el depósito de A β es similar al de la línea Tg2576, la patología asociada a tau es más severa, poniendo de manifiesto el papel que tiene A β en la enfermedad. La utilidad de este modelo es limitada por la presencia de déficits motores significativos que provienen de la línea JNPL3, y confunden los resultados de algunos tests de memoria y aprendizaje debido a que estos requieren un buen funcionamiento de estas habilidades.
- ✓ 3xTg: resultado de combinar tres transgenes: hAPP con la mutación *Swedish* KM670/671NL, *PSEN1* con la mutación M146V y htau con la mutación P301L, en el mismo fondo genético que el ratón mutante para PS1, B6;129, bajo el promotor Thy1.2. Este modelo desarrolla placas antes que aparezcan ovillos, ya que parece ser que las dos patologías se desarrollan independientemente (Hall and Roberson, 2012).
- ✓ Htau *wild type*: una alternativa al uso de htau mutada, es la sobreexpresión de htau, proteína que no presenta ninguna mutación. A diferencia de las líneas murinas anteriormente mencionadas, la presencia de htau sin mutaciones produce una aparición temprana de disfunción neuronal, aunque no presenten un elevado grado de agregación de tau. Un ejemplo de este tipo de modelos es el que expresa las 6 isoformas de tau presentes en la EA bajo el promotor de tau y en un fondo KO para tau.

Expresión de ApoE: existen modelos de tipo *knock-in* (KI) que expresan el alelo ϵ 3 o el ϵ 4. Cuando estos últimos se han cruzado con ratones transgénicos para *APP*, presentan mayor número de placas que los que expresan el ϵ 3.

Otros modelos: vertebrados

El ratón, a pesar de ser el más común, no es el único roedor utilizado. Existen modelos de rata, como la línea llamada McGill-R-Thy1-APP, con la proteína APP humana y las mutaciones *Swedish* e *Indiana*, bajo el promotor *Thy1.2*. Presenta acumulación intraneuronal de A β en corteza e hipocampo, y depósitos evidentes a los 6 meses, asociados a activación glial y neuritis distróficas. A edades más adultas presenta un daño cognitivo espacial a los 13 meses de edad (Leon, 2010).

El rápido desarrollo y corta vida del pez cebra o *zebrafish* en inglés (*Danio rerio*), hacen de este organismo un prometedor modelo para el estudio de varios desórdenes del SNC como la EA. El desarrollo de su sistema nervioso está muy bien caracterizado, y su relativamente fácil manipulación y bajo coste de mantenimiento con respecto a los roedores, hacen de este organismo un modelo muy atractivo. Respecto a los invertebrados, el pez cebra está más cerca de los humanos evolutivamente, compartiendo una homología de entre el 50% y el 80% con muchas secuencias humanas. También muestran un comportamiento de mayor orden como memoria, respuestas condicionadas o comportamientos sociales. Genéticamente, presentan dos ortólogos de APP, *appa* y *appb*, que se expresan con un patrón similar, y con un 70% de homología con la isoforma APP695 y un 80% con la región A β . Respecto a las presenilinas, se han identificado dos ortólogos, uno de *PSEN1*, *psen1*, y otro de *PSEN2*, *psen2*. Otros ortólogos encontrados son los de las cinasas implicadas en la fosforilación de tau, o el ApoE (revisado en (Saraceno et al., 2013)).

Otros modelos: invertebrados

La mayoría de los genes ligados a la EA pertenecen a vías conservadas evolutivamente ya que se pueden encontrar en muchos organismos, abriendo así un gran abanico de posibilidades de

manipulación tanto genética como farmacológica para conocer mejor sus funciones biológicas y las de sus ortólogos *in vivo*. Estas manipulaciones genéticas se realizan de forma más rápida en organismos como moscas o gusanos y pueden generar una gran cantidad de información obtenida *in vivo* que se puede extrapolar a los mamíferos. Además son más baratos de mantener, más fáciles de manipular y están muy bien caracterizados genéticamente. La mayoría de proteínas asociadas con la EA están evolutivamente conservadas en ambos organismos, siendo ideales para el estudio de funciones también conservadas en estos genes.

En la EA, el uso de estos modelos se basa en dos métodos diferentes: la manipulación genética de los genes ortólogos implicados en la enfermedad, o la expresión de proteínas humanas relacionadas con la enfermedad en los modelos. Dos de estos organismos son:

- ✓ *Caenorhabditis elegans*: este nematodo tiene un tiempo de generación de unos 3 días y un tiempo de vida de unas 3 semanas. Su sistema nervioso está formado por 302 neuronas (Brenner, 1974). Gracias a su cuerpo transparente, las células y proteínas marcadas mediante fluorescencia son muy fáciles de ver. Este organismo nos proporciona un modelo simple y útil para el estudio de la sobreexpresión de proteínas y péptidos que tienen tendencia a desarrollar un mal plegamiento. También es un buen sistema para identificar compuestos que actúen contra estos péptidos, puesto que es un sistema simple sin el componente variable del comportamiento. Su rápido ciclo de vida y su bien caracterizada genética, lo convierten en una herramienta con un gran coste-beneficio con respecto a sistemas vertebrados. En relación a la EA, el ortólogo de APP es *Apl-1*, esencial para su viabilidad, y se expresa en varios tejidos, aunque no produce ningún péptido A β por la ausencia de ortólogos de β -secretasa. Sí existen 2 ortólogos de α -secretasa, *sup-17* y *adm-4*, ortólogos de *ADAM10* y *ADAM17/TACE*, respectivamente, o de cada uno de los miembros que forman el complejo γ -secretasa, así como de tau. Es una herramienta muy versátil que permite la expresión de genes humanos y su estudio (revisado en (Chen, 2013)).
- ✓ *Drosophila melanogaster*: el corto tiempo de desarrollo, 10 días, y su corta vida, 60-80 días, hacen de la mosca un buen modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Es más complejo que el anterior ya que su cerebro contiene unas 200.000 neuronas (Zars et al., 2000). Otro aspecto atractivo de este modelo es el hecho de que casi un 70% de los genes conocidos causantes de alguna enfermedad, están conservados en moscas, incluidos los implicados en EA. El ortólogo de APP es *Appl*, y se expresa principalmente en la región cortical de su sistema nervioso. Hay una conservación funcional entre las proteínas de mosca y humano, ya que los efectos producidos por la ausencia de *Appl* son rescatados por la expresión de la proteína APP humana. En moscas también existe un ortólogo de α -secretasa codificado por el gen *kuzbanian*, y recientemente se ha identificado un ortólogo de β -secretasa, capaz de cortar *Appl*, generando un péptido A β con propiedades neurotóxicas similares al péptido humano. De la misma forma que en gusanos, en moscas también encontramos ortólogos de γ -secretasa. Existen herramientas que permiten reproducir las características neuropatológicas de la EA, como las placas o los ovillos y los defectos de memoria. La mayoría de modelos de EA se basan en la expresión de APP o A β , ya que aunque *Drosophila* expresa un ortólogo de APP, no contiene ningún péptido A β (revisado en (Chen, 2013, Saraceno et al., 2013)).

1.5.3 El modelo APP/PS1 en detalle

Muchos modelos doble-transgénicos fueron creados por aparear dos líneas transgénicas para un solo gen cada una, pero esta estrategia conlleva un gasto importante de tiempo y espacio. Una

alternativa posible sería la co-inyección de dos vectores para introducir dos genes modificados genéticamente en un mismo organismo, cada vector con su promotor propio. En general, los dos transgenes se integran en la misma localización dentro del cromosoma y co-segregan, aumentando así la probabilidad de obtener descendencia que sea doble-transgénica. La segunda aproximación para crear este tipo de modelos es construir un vector que contenga los dos genes que se quieren introducir, bajo el control de un mismo promotor. Estos dos elementos están separados por una secuencia llamada IRES (*internal ribosome entry site*), que facilita la traducción de este tipo de construcciones. Este método es muy utilizado para expresar genes reporteros junto con el gen de interés, para poder llevar a cabo un seguimiento fácil y rápido del gen insertado (Jankowsky et al., 2001).

El laboratorio del doctor D.R. Borchelt, en Estados Unidos, realizó una prueba usando las dos aproximaciones anteriores para crear un ratón doble-transgénico que modelara la enfermedad de Alzheimer, eligiendo la co-inyección como mejor método, ya que se obtenía una mayor expresión proteica, obteniendo así el modelo APP_{swe}/PSEN1ΔE9 (Jankowsky et al., 2001).

Este modelo APP/PS1, utilizado en esta tesis, consiste en un modelo doble-transgénico que expresa un gen humanizado del gen que codifica para la APP de ratón, modificando 3 aminoácidos de su estructura, y que además contiene la mutación *Swedish*, y la proteína presenilina 1 humana con una delección en el exón 9 asociada a la EA familiar, ambas bajo el control del promotor de PrP de ratón. Se puede observar una elevada producción del péptido Aβ por la mutación *Swedish* que favorece el procesamiento de la proteína APP por la vía de la β-secretasa, y que se puede detectar usando anticuerpos específicos para la secuencia humana. Ambas proteínas se pueden detectar en homogenados de cerebro entero (Jankowsky et al., 2001).

Genéticamente se obtuvo co-inyectando 2 construcciones genéticas en un pronúcleo B6C3HF2 como fondo genético, y se insertaron en un mismo locus. Una vez obtenida la descendencia, estos animales de retrocruzaron a un fondo C57BL/6J, por su mayor resistencia a la excitotoxicidad (Saraceno et al., 2013). Los dos plásmidos de expresión fueron diseñados para ser controlados por un promotor independiente cada uno, aunque en ambos casos es el promotor de PrP de ratón, dirigiendo así la expresión de ambos predominantemente en el cerebro (Jankowsky et al., 2001).

Fenotipo

Este modelo presenta un conjunto de características que permiten reproducir ciertos aspectos de la enfermedad (información obtenida de la web de *Jackson Laboratory*):

- ✓ A nivel de producción de Aβ, las mutaciones presentes en *PSEN1* causan un cambio en el ratio Aβ₄₂/Aβ₄₀ a favor de Aβ₄₂. Empiezan a desarrollar depósitos de Aβ a los 6 meses de edad, que conlleva una ralentización del aprendizaje visuoespacial, mostrando a los 9 meses de edad abundantes placas en el hipocampo y la corteza (Jankowsky et al., 2004). El número de placas sigue aumentando hasta los 12 meses (Jankowsky et al., 2004, Garcia-Alloza et al., 2006). El tipo de placas que se encuentran en estos animales son las placas densas. Las placas difusas sin un centro denso y que no reaccionan a tinciones como el *Congo red*, no aparecen en este modelo (Jankowsky et al., 2004). También presenta placas asociadas a vasos sanguíneos a los 6 meses de edad, relacionados con la CAA, de progresión lenta (Garcia-Alloza et al., 2006).
- ✓ Respecto a la aparición de ovillos neurofibrilares en este modelo no se han detectado, aunque sí presenta un incremento de tau fosforilada relacionado con la edad (Vergara et al., 2014). El grupo de D.R. Howlett hizo un estudio con otro modelo similar basado en la mutación *Swedish*

de APP y la mutación M146L en el gen PSEN1, y mostró que la aparición de placas empieza a las 8 semanas, mientras que la aparición de tau hiperfosforilada se produce a las 24 semanas. (Kurt et al., 2003).

- ✓ Presenta astrocitosis que aumenta en paralelo con el depósito de placas, con una gliosis severa que empieza sobre los 6 meses, especialmente alrededor de las placas. El número de células positivas para GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) incrementa progresivamente hasta los 15 meses (Kamphuis 2012).
- ✓ El comportamiento de estos animales también está bien caracterizado. Muestran daño en la memoria espacial sobre los 12 meses de edad, según el test *Morris water maze* (Lalonde 2005).
- ✓ También se ha detectado una elevada incidencia de ataques epilépticos o *seizures* en inglés. Estos empiezan entre los 4 y los 5 meses de edad en un 65% de los ratones transgénicos, y solo son letales en un 5% de los casos (Minkeviciene 2009).
- ✓ A nivel cognitivo, muestra déficits en la plasticidad sináptica, concretamente se ha observado a los tres meses déficit en la LTP, aunque el grado de daño no está relacionado con la edad de los 3 a los 12 meses (Volianskis 2008).
- ✓ Este modelo presenta una muerte prematura, que aparece a los 12 meses de edad aproximadamente.
- ✓ No muestran daños en el sistema olfativo.

2. La proteína priónica celular

2.1 Características generales

2.1.1 Estructura molecular y patrón de expresión

El gen y las características estructurales de la proteína

La proteína priónica celular (PrP^C) es una glicoproteína de 253 aminoácidos, en humanos, con un peso molecular de 32 - 35 kDa, anclada a la membrana celular por un dominio glicosil fosfatidil inositol (GPI), y altamente conservada filogenéticamente. Fue descubierta cuando se estaba caracterizando el agente causante de una prionopatía presente en ovejas, la *scrapie* (ver apartado 2.2.1 para más detalles).

El gen que codifica para PrP^C, *PRNP*, está localizado en la región p12/p13 del cromosoma 20 en humano, y en el cromosoma 2 en ratón. Este gen tiene una longitud de 20 kb y está compuesto por 2 exones en humanos, o por 3 exones en rata o ratón (Gambetti et al., 2003). Además, se han identificado genes parálogos en gallinas, anfibios, reptiles y peces.

Estudios genéticos realizados con humanos han revelado la existencia de genes homólogos a *PRNP*. Dos de ellos, *PRND* y *PRNT*, están localizados en el mismo cromosoma, concretamente en una región de 55kb, que se ha denominado el locus de PrP (Mehrpour and Codogno, 2010).

PRND codifica para una proteína de 179 aminoácidos llamada "DOPPEL", y contiene también, igual que *PRNP*, 2 exones. Esta proteína, similar a PrP^C en términos de estructura y topología, mantiene una homología del 25% en la secuencia de aminoácidos con la región globular de PrP^C, ya que no contiene los OR, y se expresa en varios tejidos durante el desarrollo embrionario, especialmente en los testículos (Westaway et al., 2011). A nivel fenotípico, su sobreexpresión causa ataxia y degeneración del cerebelo, y fueron descritos en una cepa de ratón *knockout* para PrP^C conocida como *Nagasaki* (Moore et al., 1999). En el apartado 2.1.2 se describirá esta cepa más en detalle.

PRNT, identificado recientemente en humanos, codifica para 3 posibles mensajeros o mRNA por *splicing* alternativo, y se expresa exclusivamente en el testículo adulto. Se cree que este gen no codifica para ninguna proteína (Mehrpour and Codogno, 2010).

El cuarto gen que presenta homología con *PRNP* es *SPRN*, que se encuentra en los cromosomas 7 y 10, en ratón y humano respectivamente, y codifica para la proteína "SHADOO" (Daude and Westaway, 2011). A diferencia de DOPPEL, SHADOO parece tener un patrón de expresión restringido al cerebro. Presenta cierta homología con PrP^C y con su patrón de expresión, hecho que hace pensar en un mecanismo compensatorio por parte de esta proteína ante la falta de PrP^C (revisado en (Mehrpour and Codogno, 2010)).

La estructura tridimensional de PrP^C fue determinada mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (Zahn et al., 2000). Tal y como se puede ver en la figura 14, estructuralmente la proteína se puede dividir en un dominio N-terminal largo y flexible de unos 100 aminoácidos, sin estructura secundaria y en un dominio C-terminal más estructurado y globular de otros 100 aminoácidos aproximadamente (figura 14). La región N-terminal puede subdividirse en: un péptido señal que corresponde a los primeros 22 aminoácidos de la secuencia (residuos 1-22), 4 o 5 regiones en las que se repite una secuencia de 8 aminoácidos (PHGGGWGQ) llamados *octarepeats* (OR) (residuos 51-91), un dominio central (CD) formado por una región rica en residuos cargados positivamente (CC) y por una región hidrofóbica (HD) con los residuos 106-126 altamente conservados, 3 secuencias peptídicas formando 3 hélices alfa (α_1 , α_2 , α_3), dos secuencias peptídicas formando

una estructura de hélice beta, y un péptido señal (residuos 231-253) que se elimina para poder incorporar el dominio GPI de anclaje a la membrana (revisado en (Watts and Westaway, 2007, Linden et al., 2008, Mehrpour and Codogno, 2010, Biasini et al., 2012)).

La región que corresponde a los residuos 23-31 en ratones, tiene un papel conocido en el tráfico endocítico de la proteína y en su localización en las balsas lipídicas, y es esencial para la protección que ejerce frente a la degeneración causada por *DOPPEL* en neuronas granulares del cerebelo (NGC, o CGN del inglés *cerebellar granule neurons*). Otros estudios sugieren que los residuos 23 al 32 son importantes para las funciones de neuroprotección de PrP^C, ya que las deleciones en los residuos 32-121 o 32-134, conjuntamente denominadas PrP^{ΔN}, causan neurodegeneración progresiva en ratones que no tienen PrP^C endógena, y la deleción de los residuos 23 al 88 impide que PrP^C rescate la toxicidad mediada por *Doppel*. Parece ser, entonces, que la localización celular de PrP^C es importante en sus funciones de neuroprotección (Mehrpour and Codogno, 2010).

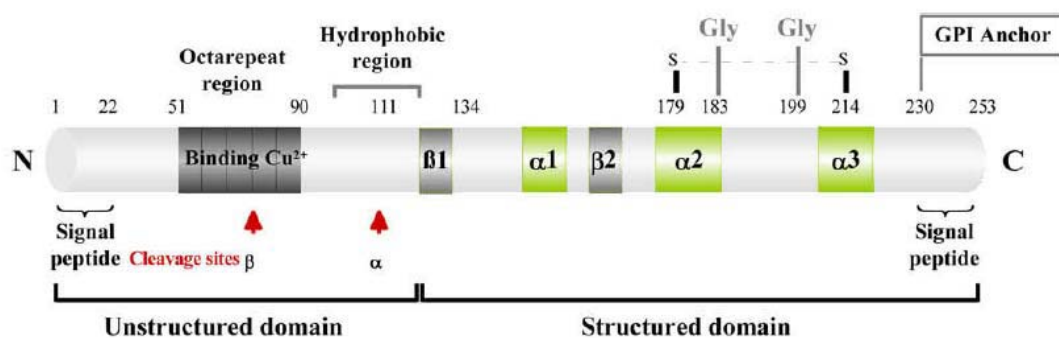


Figura 14. Estructura de la proteína PrP^C. En gris vemos los *octarepeats*, donde se unen los iones de cobre; a continuación vienen la zona de cargas positivas y la zona hidrofóbica; en gris claro vemos las láminas-β, y en verde las hélices-α. Tomado de Mehrpour, 2010.

Respecto a la región central (CD), la región hidrofóbica está implicada en la regulación del retículo endoplasmático (RE), y su ausencia está relacionada con degeneración celular. Concretamente, esta región promueve la dimerización de PrP^C, incrementando la actividad protectora al estrés de la proteína. En enfermedades como las prionopatías, donde encontramos una forma mal plegada de la proteína llamada PrP^{Sc}, la supervivencia celular se ve afectada por el bloqueo de la formación de estos dímeros (Nicolas et al., 2009).

Los OR también han sido ampliamente estudiados, viéndose que al ser una zona de unión a cobre, juegan un papel fundamental frente a algunas funciones descritas para la proteína (ver apartado 2.1.2). Esta región también se ha visto implicada en el control de la autofagia en neuronas (Mehrpour and Codogno, 2010).

PrP^C ha sido ampliamente estudiada por su implicación en las enfermedades priónicas (ver apartado 2.2) otorgando a los codones localizados entre los residuos 90 y 130 un papel clave en la transmisibilidad de los priones (Nicolas et al., 2009), aunque el anclaje tipo GPI también se cree que es un factor clave en estas enfermedades. Estos estudios demuestran que PrP^C es indispensable para las prionopatías, y la interacción de esta proteína con la membrana plasmática contribuye a la neurodegeneración.

Biología celular de PrP^C

La biogénesis de PrP^C se caracteriza por un conjunto de modificaciones post-traduccionales que implican: i) la eliminación del péptido señal que se encuentra entre los primeros 22 aminoácidos,

para guiar la proteína al RE, ii) la unión de dos cadenas de oligosacáridos (Lawson et al., 2005), iii) formación de puentes disulfuro y iv) adición del dominio GPI. Tras la síntesis de PrP^C en los ribosomas, la proteína se transporta al RE, desde donde es dirigida al aparato de Golgi, y posteriormente a la superficie celular. Allí es ubicada en unos dominios conocidos como balsas lipídicas (Mehrpour and Codogno, 2010) (ver figura 15).

En el RE, tanto el péptido señal de la región N-terminal (residuos 1-22), como el del extremo C-terminal, (residuos 231-253), se escinden de la proteína para su posterior unión del dominio GPI en la parte C-terminal (Stahl et al., 1987). A continuación, dos cadenas de oligosacáridos se unen a los residuos Asn181 y Asn197 (Haraguchi et al., 1989), y se forma un puente disulfuro entre las cisteínas 179 y 214 (Rudd et al., 2002). En el Golgi, estas cadenas de oligosacáridos se modifican mediante la adición de ácido sálico. Seguidamente, PrP^C es hidroxilada en la posición prolina 44 de forma específica al tipo celular, que cambia la estructura de su dominio N-terminal, importante para su tráfico subcelular (Gill et al., 2000).

Glicosilación:

PrP^C contiene 2 sitios de glicosilación, y se puede encontrar en tres estados de glicosilación diferenciales: no glicosilada, monoglicosilada o diglicosilada, que se reflejan en un patrón característico de migración en técnicas de separación de proteínas por peso molecular como la electroforesis-*western blot*. La importancia de este proceso para el papel fisiológico de la proteína no está del todo clara, a pesar de que estos puntos de glicosilación están ampliamente conservados entre mamíferos, pero sí que afecta a su tráfico intracelular y a la unión de ligandos (Paulson, 1989, Lis and Sharon, 1993, Lawson et al., 2005).

Estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición de la glicosilación de PrP^C promueve la formación de moléculas similares a PrP^{Sc} (Nicolas et al., 2009).

Procesamiento proteolítico:

Como otras proteínas de membrana, PrP^C puede ser procesada mediante dos vías proteolíticas. La vía normal constitutiva, también llamada *α-cleavage* (Mange et al., 2004), ocurre en el cerebro, aunque también se ha visto en cultivos, entre los residuos histidina 110 y metionina 111, dando lugar a la formación de un péptido N-terminal de 9 kDa, soluble, y a un fragmento C-terminal de 17kDa que sigue unido a la membrana por su dominio GPI (Shyng et al., 1993, Jimenez-Huete et al., 1998). Esta vía es llevada a cabo por 2 miembros de la familia ADAM, ADAM10 y ADAM17 (Vincent et al., 2001), y está estimulada por agonistas de la vía de la PKC (Chen et al., 1995, Vincent et al., 2000).

PrP^C también puede ser procesada dentro o en las regiones colindantes a los OR, generando así un fragmento C-terminal llamado C2, de 19 kDa, unido a la membrana por el dominio GPI, y un fragmento N-terminal llamado N2 (Taraboulos et al., 1992, Jimenez-Huete et al., 1998). Este proceso es mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*).

Endocitosis e internalización

PrP^C puede ser internalizado constitutivamente de la membrana plasmática. La ruta y el mecanismo con el que PrP^C es internalizado están aún bajo debate ya que puede estar mediada por vía dependientes de caveolas o dependientes de clatrina (Johannes and Lamaze, 2002, Peters et al., 2003).

En la membrana celular, esta proteína se encuentra localizada en las balsas lipídicas, y es necesario que la proteína se mueva fuera de estos dominios para una correcta internalización. Este

movimiento ocurre después de la unión de cobre a los OR, pero también puede ser mediada por Zinc (Perera and Hooper, 2001, Hooper et al., 2008b). Se ha visto que concentraciones micromolares de cobre estimulan la endocitosis de PrP^C de la superficie celular por una vía dependiente de clatrina (Westergard et al., 2007), que requiere una unión a cobre y la salida de PrP^C de las balsas lipídicas.

Además, la carencia de dominio citoplasmático de esta proteína hace patente la necesidad de unirse a otras proteínas de membrana para que pueda internalizarse. Algunas de estas proteínas son el receptor de laminina o el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LRP1) (Gauczynski et al., 2001).

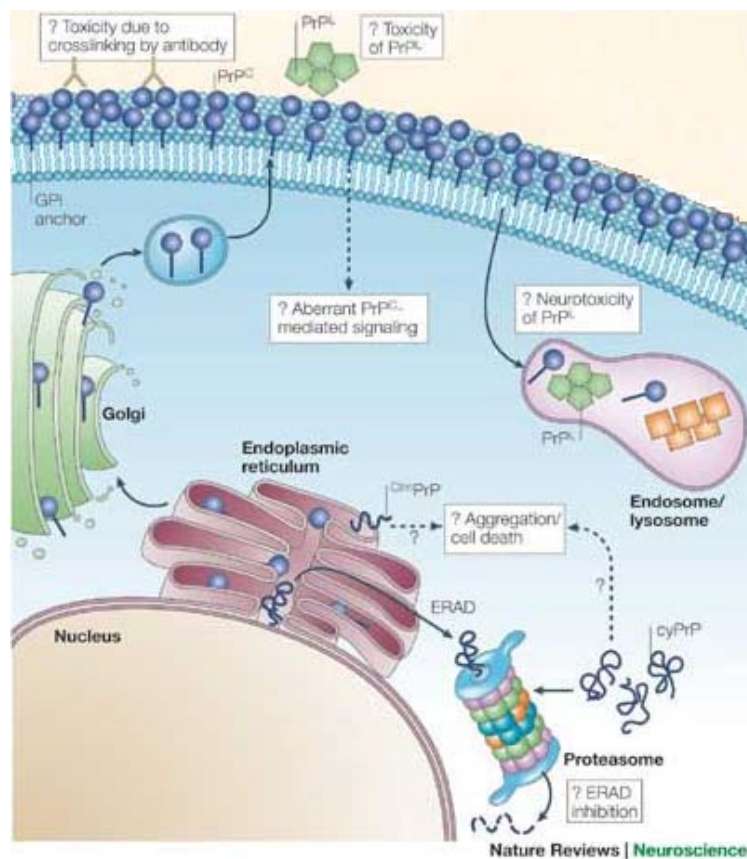


Figura 15. Procesamiento de la proteína PrP^C. Una vez la proteína se sintetiza en el retículo endoplásmico, es llevada al aparato de Golgi donde se somete a una serie de modificaciones post-traduccionales, entre las que se encuentra la unión del dominio GPI para su posterior anclaje a la membrana. Una vez en la superficie, se internaliza al sistema de vesículas endocíticas por vías dependientes y/o independientes de clatrina, para que pueda ser reciclada o degradada. Adaptado de Malluci G., 2005.

Topología

Después de su translocación al RE, PrP^C puede adoptar topologías distintas según su localización celular. Existen 2 formas transmembrana con topologías opuestas (^NtmPrP, donde el N-terminal está en el lumen del RE, o ^CtmPrP, donde el C-terminal está en el lumen del RE), en función de la orientación de sus secuencias con respecto al lumen del RE (Hegde et al., 1998, Harris, 2003). Aunque el papel de estas topologías es desconocido, la topología ^CtmPrP, que corresponde a un 35% del total de moléculas presentes de PrP^C (Roucou et al., 2004), está asociada a procesos patológicos más que a procesos neuroprotectores (Hegde et al., 1998, Hegde et al., 1999). De

hecho, se ha visto que la expresión de estas dos topologías en animales transgénicos induce fenotipos neurodegenerativos (Stewart and Harris, 2003).

También se han desarrollado formas de PrP^C para que permanezcan en el citoplasma de la célula, quitando sus péptidos señales de las regiones N-terminal y C-terminal, o usando inhibidores del proteasoma (Ma et al., 2002), y se ha descrito que PrP^C puede acumularse en el citoplasma, en una forma llamada ^{Cyt}PrP, correspondiente a una fracción de moléculas mal plegadas que son enviadas al citosol para ser degradadas por el proteasoma (Ma et al., 2002, Stewart and Harris, 2003, Wang et al., 2009). La acumulación intracelular de esta forma de la proteína puede llegar a ser tóxica para la célula, aunque esta propiedad está todavía por confirmar (Roucou et al., 2003, Fioriti et al., 2005).

Señalización intracelular

Debido a que la mayor parte de moléculas de PrP^C están ancladas a la membrana, es lógico pensar que podrían participar en procesos de señalización (Tsui-Pierchala et al., 2002, Taylor and Hooper, 2006). La ausencia de dominio transmembrana de PrP^C hace suponer que necesita interactuar con una proteína adaptadora transmembrana para transmitir las señales al citoplasma, actuando entonces como una posible plataforma de señalización (Mouillet-Richard et al., 2000). De hecho, PrP^C se encuentra en los dominios de la membrana llamados balsas lipídicas, introducidos en el apartado 1.2.2, donde se concentran proteínas de señalización, y la presencia de PrP^C en estos dominios abre la posibilidad de que PrP^C desencadene señales dentro de la célula (Roucou et al., 2004). Actualmente hay varios estudios que relacionan a PrP^C con diferentes vías de señalización relacionadas con la supervivencia neuronal, el crecimiento neurítico o la neurotoxicidad.

En experimentos usando anticuerpos anti-PrP^C, se indujo la agregación de PrP^C en la superficie celular, reproduciendo probablemente, lo que ocurre cuando un ligando se une a PrP^C, viéndose una activación de la tirosina-cinasa *fyn*, acción que requiere de la interacción de PrP^C con la proteína caveolina presente en un tipo de balsa lipídica llamada caveola. La activación de *fyn* estimularía la oxidasa NADPH y las cinasas reguladas extracelularmente (ERKs, del inglés *extracellular-regulated kinases*), así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mouillet-Richard et al., 2000, Schneider et al., 2003). Esta vía se cree que tiene efectos a favor de la supervivencia.

Otra vía de señalización involucra a la proteína inducible por estrés o STI-1 (del inglés, *stress-inducible protein 1*). Aunque ésta se encuentra principalmente en el citoplasma o el núcleo, hay evidencias de que unas cuantas moléculas residen en la membrana, donde interactuaría con PrP^C. En cultivos de células de hipocampo con STI-1 recombinante, se ha visto una estimulación del crecimiento neurítico de manera dependiente de PrP^C, y requiere la señalización a través de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) (Westergard et al., 2007).

Otros estudios han sugerido que las vías de señalización de fosfoinositol 3 cinasa (PI3K)/Akt (también conocida como proteína cinasa B (PKB)), podrían participar en los efectos neuroprotectores de PrP^C. La actividad Akt es menor en neuronas procedentes de animales KO para PrP^C (Weise et al., 2006, Westergard et al., 2007).

Otras vías en las que participa PrP^C están relacionadas con el crecimiento neurítico, interactuando vía *cis* y *trans* con N-CAM, una molécula de adhesión neuronal, cuando ésta es reclutada en las balsas lipídicas y se activa Fyn (Santuccione et al., 2005).

Por otra parte, PrP^C también puede mediar efectos neurotóxicos. El péptido sintético PrP₁₀₆₋₁₂₆, con propiedades bioquímicas similares a PrP^{Sc}, usándose de hecho como modelo de ésta en cultivo, es capaz de inducir toxicidad solamente en células que expresan PrP^C, sugiriendo que PrP^C está mediando este proceso.

Expresión tisular y distribución celular

PrP^C está altamente expresada en el sistema nervioso, aunque su contenido varía en distintas regiones cerebrales (cerebelo, bulbo olfativo, sistema límbico, isocorteza (Sales et al., 1998), diferentes tipos celulares (neuronas y células gliales), y entre neuronas con fenotipos neuroquímicos distintos. También la podemos encontrar en varios componentes del sistema inmune y en otros órganos como el estómago o el riñón (Nicolas et al., 2009). Filogenéticamente, se expresa en todos los mamíferos conocidos. La expresión de la proteína está regulada durante el desarrollo del SNC, incrementando a los 7-8 días de edad embrionaria (E7.5), hasta los 20 días después del nacimiento (P20) (Miele et al., 2003, Tremblay et al., 2007). En neuronas, la podemos encontrar en axones, dendritas y compartimentos endocíticos (Nicolas et al., 2009).

El péptido señal de 22 aminoácidos, una vez cortado, hace que la mayor parte de las moléculas de PrP^C sean exportadas a la superficie celular, normalmente en las balsas lipídicas (Vey et al., 1996). En células polarizadas, PrP^C también se encuentra asociado con microdominios resistentes a detergentes, pero tienen una localización basolateral, hecho inusual en proteínas ancladas por un dominio GPI (Sarnataro et al., 2002).

El estudio de la expresión de esta proteína ha conllevado la aparición de discrepancias entre diferentes resultados. Estas diferencias son debidas a limitaciones técnicas y al uso de anticuerpos que pueden no detectar algunas diferencias en estructura o patrón de glicosilación de la proteína en diferentes poblaciones celulares (DeArmond et al., 1999, Beringue et al., 2003).

En enfermedades como la EA, la expresión de la proteína aumenta al inicio de la enfermedad, pero sus niveles disminuyen progresivamente durante la enfermedad, probablemente debido a la elevada pérdida neuronal (McNeill, 2004, Llorens et al., 2013a, Vergara et al., 2014).

2.1.2 Funciones fisiológicas

Diversos trabajos realizados con ratones mutantes para PrP^C o bien mediante cultivos celulares *in vitro*, han permitido obtener información sobre el papel fisiológico de la proteína. De este modo, han mostrado la participación de PrP^C en procesos como: neurogénesis y diferenciación de células madre neurales, neuritogénesis, interacción con moléculas y cascadas de señalización, sinaptogénesis, supervivencia celular mediante funciones anti o pro-apoptóticas, unión a cobre, homeostasis redox, desarrollo de células T, diferenciación y modulación de la fagocitosis de los leucocitos y/o alteración del reclutamiento de leucocitos al sitio de inflamación (ver (Lasmezas, 2003, Westergard et al., 2007, Linden et al., 2008) para revisión). A continuación se describen los principales modelos disponibles y algunas de las principales funciones atribuidas a la proteína en estos procesos:

Modelos murinos para el estudio de PrP^C

El uso de la recombinación homóloga permitió la generación de ratones en los que el gen que codificaba para la proteína PrP^C estaba suprimido. El primer ratón KO fue un modelo con un fondo génico mixto C57BL/6J x 129/Sv(ev), reemplazando los codones 4-187 por un casete de expresión de la fosfotransferasa de neomicina (neo). Estos animales fueron llamados *PRNP^{0/0}* o también

Zurich I (Bueler et al., 1992). El fondo genético mixto presente en este modelo ha sido una barrera para interpretar algunos experimentos relacionados con el comportamiento.

Otra línea de ratones KO fue generada con la interrupción de la pauta de lectura (ORF, del inglés *open Reading frame*) en la posición 93, y la introducción de un casete neo. Estos animales, conocidos como *PRNP^{0/0} Edinbrugh*, tienen un fondo genético 129/Ola (Manson et al., 1994).

Estas dos líneas de ratones mostraban resistencia a priones pero ningún otro fenotipo observable a primera vista, llevando a la conclusión entonces de que esta proteína no era necesaria para un desarrollo normal o bien que su ausencia era compensada por otras proteínas homólogas. Sin embargo, unos años más tarde aparecieron estudios describiendo alteraciones en el sistema nervioso de estos animales, como cambios neurofisiológicos discretos y desmielinización de los nervios periféricos con la edad (Mehrpour and Codogno, 2010), lo que llevó a describir las primeras funciones de la proteína.

A partir de los modelos antes mencionados, surgieron otros KOs como la cepa *Zurich II*, la *Rcm0* o la *Nagasaki*. Estas cepas generaron discrepancias a nivel del papel fisiológico de PrP^C, puesto que aparecieron en ellos, fenotipos de ataxia y pérdida selectiva de células de *Purkinje* causando degeneración cerebelar. La generación de modelos con la forma truncada de la proteína, sirvió para observar que la sobreexpresión de la proteína DOPPEL, era la causante de la neurodegeneración vista en estos modelos (Moore et al., 1999, Linden et al., 2008). El gen que codifica DOPPEL se encuentra en el mismo cromosoma que PrP^C a una distancia de unas 20kb (Mehrpour and Codogno, 2010), y al producirse una delección en el gen *PRNP* que se extendía más allá del exón 3, la proteína DOPPEL pasaba a estar controlada por el promotor del gen *PRNP* y por tanto expresada a niveles elevados en el cerebro (Moore et al., 1999, Li et al., 2000). DOPPEL se sobreexpresa en las cepas *Nagasaki*, *Zurich II*, y *Rcm0*, pero no en otras como *Zurich I*.

No solo se generaron animales KO para la proteína, sino también cepas que sobreexpresaban PrP^C, y de sobreexpresión de formas truncadas de la proteína, sobre el animal KO *Zurich I*, para obtener más información del papel de las diferentes partes que conforman la proteína (Linden et al., 2008). Por ejemplo, delecciones en los residuos 32-121 o 32-134 llevaba a un fenotipo similar al encontrado en los animales que sobreexpresaban DOPPEL, ya que la proteína obtenida sin estos aminoácidos es estructuralmente similar a DOPPEL (Mehrpour and Codogno, 2010).

En los modelos truncados de PrP^C y expresión de DOPPEL, se estableció una posible hipótesis: PrP^C se uniría a un putativo ligando, induciendo una señalización específica intracelular que llevaría a la supervivencia neuronal. En ausencia de PrP^C, un homólogo redundante con una afinidad inferior la reemplazaría, explicando la ausencia de neurodegeneración en los ratones KO. En presencia de la proteína DOPPEL o formas truncadas de PrP^C en su extremo N-terminal, competirían con ese homólogo, evitando entonces que se enviase señales de supervivencia. En cambio, activarían vías de muerte celular programada que normalmente no lo están gracias a PrP^C o su homólogo. La identidad de este homólogo no se conoce (Linden et al., 2008), siendo PrP^C entonces un punto dinámico para la unión de moléculas de señalización que participarían en procesos neuronales, como la diferenciación neuronal (Nicolas et al., 2009).

Comportamiento

A nivel de comportamiento, uno de los primeros fenotipos descritos fue el deterioro en la coordinación motora, pero como este era presentado por la cepa *Nagasaki*, se estableció que estaba correlacionado con el incremento de expresión de *Doppel*, y no por la ausencia de PrP^C (Moore et al., 1999).

En otro modelo como el *Zurich I*, los animales mostraban un pequeño incremento en la actividad motora durante la exploración de un objeto nuevo (Roesler et al., 1999). Además, también mostraban cambios en el sistema glutamatérgico, mientras que tanto el dopaminérgico como el adenosinérgico estaban preservados. Los animales también mostraban niveles más bajos de ansiedad, una respuesta que protege al individuo en las situaciones de peligro, indicando que PrP^C ayudaría en la adaptación al estrés. (Coitinho et al., 2002).

Memoria

Los primeros experimentos realizados en la cepa *Zurich I* no mostraron alteraciones de memoria (Bueler et al., 1992), pero otros estudios sí lo hicieron, mostrando un deterioro de la memoria a los 9 meses (Coitinho et al., 2003). Otra cepa, la *Npu*, también mostraba un deterioro en el aprendizaje espacial dependiente de hipocampo. Estos déficits fueron rescatados al volver a expresar la proteína, indicando que eran causa de la ausencia de PrP^C (Criado et al., 2005).

Otra aproximación utilizada para el estudio del impacto de PrP^C en la memoria, fue mediante el uso de anticuerpos o agonistas administrados a los ratones, anti- PrP^C o anti-laminina, que vieron que provocaban un daño en la consolidación de la memoria. Ambos tipos de anticuerpos también inhibían la activación de la proteína cinasa A (PKA) y ERK1/2 del hipocampo, dos cinasas relacionadas con la consolidación de la memoria, mostrando así el papel importante de PrP^C en el procesamiento de la misma (Coitinho et al., 2006).

Resultados similares en humanos apoyan el papel de PrP^C en la memoria. La presencia del aminoácido valina en el codón 129 del gen *PRNP* en al menos un alelo, está asociado con un peor rendimiento cognitivo en personas mayores, y un descenso más rápido de las habilidades intelectuales en pacientes con SD. Entonces, los polimorfismos en el codón 129 de la proteína, un punto importante para la estructura de la proteína, parecen estar relacionados con el rendimiento cognitivo (Linden et al., 2008).

PrP^C, actividad sináptica y excitabilidad neuronal

La implicación de PrP^C en procesos como la memoria hace pensar en cómo PrP^C afecta a mecanismos sinápticos y a la excitabilidad neuronal. PrP^C se expresa en todo el SNC, pero sus niveles son particularmente elevados en zonas como el hipocampo o la corteza frontal. También presenta una amplia distribución subcelular, incluyendo las sinapsis. Parece estar implicada en varios procesos como el crecimiento neurítico, tanto de axones como dendritas, e incluso podría estar implicada en la función sináptica, desarrollando un papel tipo neuroprotector.

Estudios demuestran que PrP^C podría tener un papel en la estructura sináptica, la función o el mantenimiento. De hecho, la patología sináptica es una característica observable en prionopatías. Estudios de microscopía electrónica y fluorescencia, mediante el uso de una proteína de fusión formada por PrP^C y la proteína verde fluorescente, EGFP, han permitido ver que PrP^C se encuentra preferentemente a lo largo de los axones y en los terminales presinápticos, aunque también se ha visto en zonas post-sinápticas (Linden et al., 2008). De hecho, en cultivos de neuronas de hipocampo con PrP^C recombinante, se induce una rápida formación de axones y dendritas, e incrementa el número de contactos sinápticos (Westergard et al., 2007).

También sabemos que PrP^C es capaz de unirse al cobre y las terminaciones nerviosas liberan cobre a la hendidura sináptica cuando se despolarizan. Se propuso entonces que las moléculas de PrP^C pre-sinápticas podrían asegurar su transporte de vuelta al citosol. Este papel relacionado con el cobre también podría tener una función en la homeóstasis del calcio, puesto que el cobre, a las concentraciones a las que se encuentra en la hendidura sináptica, reduce el flujo de calcio a través

de los canales de calcio (Vassallo and Herms, 2003). De hecho, habiendo visto la concentración sináptica de PrP^C en neuronas, y que PrP^C se une a cobre, se propuso que esta tiene un efecto protector en la toxicidad de cobre en la sinapsis, en vez de un papel en la neurotransmisión (Brown, 2001).

En ratones KO para PrP^C se vio un deterioro en el aprendizaje espacial y una alteración de la neurotransmisión (Collinge et al., 1994, Criado et al., 2005). En estos ratones también se observó un incremento en la excitabilidad neuronal, así como una mayor excitotoxicidad por glutamato por la modulación de los receptores de NMDA (NMDARs) y de kainato (Nicolas et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que PrP^C es capaz de atenuar la excitotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, inhibiendo los NMDARs que contienen subunidades NR2D (Khosravani et al., 2008). PrP^C y neuritogénesis

Como se ha mencionado en el apartado de señalización intracelular (2.1.1), PrP^C interacciona con moléculas de adhesión como N-CAM, una interacción que en cultivos de neuronas de hipocampo se ha visto que resulta en un reclutamiento de esta molécula a las balsas lipídicas, la activación de Fyn y un potenciamiento del crecimiento neurítico (Santuccione et al., 2005). La unión de PrP^C a laminina también se ha relacionado con un aumento del crecimiento neurítico (Westergard et al., 2007).

PrP^C también parece tener un papel neuroprotector en relación al estrés oxidativo. Esta hipótesis se corrobora porque también hay evidencias *in vitro* que indicarían que PrP^C podría proteger a las células del mismo. Esta modulación se podría llevar a cabo regulando la actividad superóxido dismutasa-1 (SOD-1) dependiente de cobre. Esta actividad es intrínseca de la proteína, pero, no se ha podido encontrar *in vivo* (Nicolas et al., 2009). PrP^C contribuiría en la unión a cobre, incrementando también la actividad SOD, y aumentando la resistencia a dicho estrés. Otras evidencias apoyan esta hipótesis, ya que cultivos de animales KO para PrP^C son más susceptibles a éste que las células WT (Brown et al., 1997). De hecho, la ausencia de esta protección frente al estrés oxidativo, estaría relacionada, aunque no sería una causa directa, con una menor resistencia a los ataques epilépticos, siendo los KO más susceptibles a estos (Walz et al., 1999, Pereira et al., 2001). La eliminación de la región OR de la proteína elimina esta función antioxidante (Brown et al., 1999).

PrP^C y el sistema inmune

Aunque en los animales KO no se vieron mayores alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune, recientemente se ha sugerido que PrP^C podría ser necesaria para la auto-renovación de las células madre hematopoyéticas.

PrP^C también se expresa en linfocitos T y B en humanos, monocitos y células dendríticas, entre otras poblaciones. Durante la activación de las células T, la proteína está sobrerregulada, y se cree que podría tener un papel funcional en el desarrollo, activación y proliferación de células T (Hu et al., 2008a).

Fagocitosis de células apoptóticas. SIRP α

Un estudio reciente del grupo de A. Aguzzi, publicado en 2013, pone en entredicho una de las funciones atribuidas a PrP^C: la fagocitosis de células apoptóticas. El problema tiene su raíz en la manera como se han estudiado las posibles funciones de la proteína, es decir, mediante el uso del animal KO para PrP^C, concretamente la cepa llamada *Zurich I*. Esta cepa, ya sea en su fondo genético mixto 129-B6 o en el fondo 129, presenta un fragmento derivado del cromosoma 2 procedente del fondo 129. Este fragmento, en homocigosis, correlaciona con un fenotipo de mayor fagocitosis

que parece ser independiente de PrP^C. En este fragmento existen los llamados genes flanqueantes, que el grupo de Aguzzi ha secuenciado, encontrando un candidato que corresponde a la proteína alfa reguladora de señal o SIRP α , del inglés *signal regulatory protein alpha*, proteína inhibidora de la fagocitosis. Los ratones KO para SIRP α comparten un gran número de fenotipos con los animales KO para PrP^C, como los de tipo neuroinmunológicos o los metabólicos (Nuvolone et al., 2013).

Por el contrario, la cepa de Manson et. al., no presenta este problema, ya que no existen estos genes flanqueantes presentes en las otras cepas. De hecho, fenotipos como el de la fagocitosis no pudieron ser corroborados en este modelo (Nuvolone et al., 2013).

Las funciones anteriormente mencionadas deberán ser corroboradas en el modelo de Manson o mediante otras cepas que no presenten estos genes flanqueantes, para evitar la interferencia de éstos y descubrir cuáles de las funciones actualmente atribuidas a PrP^C son legítimas. Existen también discrepancias en algunos de los resultados referentes a las funciones de PrP^C, como el papel de esta en la señalización inducida por A β . Estas discrepancias podrían ser atribuidas, en algunos casos, a los polimorfismos que afectan a estos genes flanqueantes. El uso de otros modelos o técnicas ayudaría a reforzar este hecho (Nuvolone et al., 2013).

2.2 Prionopatías

2.2.1 El prión como agente infeccioso

Descripción general

Las prionopatías, también conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs, o TSEs, del inglés *transmissible spongiform encephalopathies*), son enfermedades neurodegenerativas que afectan al SNC tanto de humanos como de una gran variedad de animales (Prusiner, 1998). Su origen puede ser genético o esporádico, aunque también hay evidencias de que su origen puede ser adquirido. El principal rasgo neuropatológico que las caracteriza es el acúmulo de la proteína PrP^{Sc}, forma mal plegada de la proteína PrP^C, llamada así por ser el agente causante de una enfermedad llamada *scrapie*, común en ovejas y cabras. La forma patológica de la proteína es también llamada a menudo PrP^{res} porque suele presentar una resistencia parcial a la proteólisis por proteinasa k, diferenciándose de este modo de la conformación fisiológica PrP^C (Linden et al., 2008). A nivel morfológico y patofisiológico, pueden presentar cambios similares a otras encefalopatías progresivas, como la EA o la enfermedad de Parkinson (EP), como la presencia de depósitos amiloides (DeArmond et al., 1985, Kitamoto et al., 1986). Los síntomas clínicos comprenden tanto déficit cognitivo como motor (Aguzzi and Haass, 2003), aunque las características de cada enfermedad de detallaran en el apartado 2.2.2..

Entre estas encefalopatías de origen genético o esporádico se encuentran el *Kuru*, la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (ECJ o CJD, del inglés *Creutzfeldt-Jakob disease*) el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) o el insomnio familiar fatal (IFF o FFI, del inglés *fatal familial insomnia*), que afectan a humanos, y el *scrapie* o la encefalopatía espongiforme bovina (EEB o BSE, del inglés *bovine spongiform encephalopathy*), entre otras, que afectan a ovejas y vacas, respectivamente (Aguzzi and Calella, 2009). Las formas adquiridas de las prionopatías pueden presentarse mediante ingestión de priones por vía alimentaria, o por escarificación de encías, piel y tejido conjuntivo (Beekes and McBride, 2007). Experimentalmente, la inoculación se puede hacer tanto de manera intracerebral, como intraperitoneal o intravenosa. La capacidad del prion de propagarse, depende del sitio de entrada, la cepa, la dosis, y de la especie y el genotipo de PrP del huésped (Beekes and

McBride, 2007). La prevalencia de estas enfermedades es relativamente baja, pero aún no se ha descubierto una cura para ellas (Linden et al., 2008).

Existe una barrera interespecífica que impide, por ejemplo, que los priones procedentes de la cepa *scrapie* no puedan infectar a humanos, pero sí que se han podido transmitir a renos. También, se han detectado casos en los que esa barrera se ha conseguido sobrepasar, como por ejemplo la variante de la ECJ, que apareció, parece ser, por transmisión de la EEB a humanos por ingestión de material infectado con priones (se pueden encontrar más detalles en el apartado 2.2.2). Estas diferencias pueden ser debidas a variaciones en la proteína PrP^C entre especies, así como en su estructura o plegamiento, estableciendo, recientemente, que la presencia de *loops* flexibles y las hojas beta en la forma celular participaban en la resistencia a ciertas cepas de priones, mientras que la presencia de un extremo c-terminal no flexible, confería resistencia a otras cepas (Hagiwara et al., 2013).

Cambios como mutaciones puntuales o inserciones están relacionados con las prionopatías de origen genético. Se conocen unos 15 polimorfismos en el gen *PRNP*, asociados al codón 129, donde la presencia de una metionina o una valina pueden afectar gravemente el tipo, el inicio y la duración de la enfermedad (Gambetti et al., 2003), y tienen una influencia clara en todas las formas de la enfermedad (Prusiner, 1998, Kovacs et al., 2002b). Las mutaciones relacionadas con la estructura también parecen tener un papel en el desarrollo de ciertas prionopatías (Kiachopoulos et al., 2005, Lawson et al., 2005), como la inserción de 9 ORs en el gen, que se ha asociado con un fenotipo progresivo neurológico sin transmisibilidad (Weissmann and Flechsig, 2003).

Los tejidos mayoritariamente implicados en la infección comprenden el tejido linfoide, donde se acumula, se propaga por el sistema nervioso periférico, asciende hasta el SNC, y eventualmente se propaga del SNC a tejidos periféricos como el músculo, probablemente a través de proyecciones nerviosas. En el cerebro, el prion se deposita en forma de estructuras similares a placas, aunque también se puede acumular en astrocitos y microglía (Fournier et al., 2000, Kovacs et al., 2002a).

El diagnóstico de estas enfermedades sigue siendo un tanto primitivo. En estadios presintomáticos es imposible de determinar, y el diagnóstico más temprano posible se basa en la presencia de signos y síntomas clínicos, es decir, cuando ya se ha producido una propagación considerable de la enfermedad (Aguzzi and Calella, 2009). En 1997, se produjo un gran avance en este campo cuando se descubrió la presencia de PrP^{Sc} en las amígdalas o tonsilas de pacientes con la variante de ECJ (Hill et al., 1997), así como en otros tejidos linfoides, hecho que también fue corroborado en pacientes con ECJ esporádica (Glatzel et al., 2003), indicando que se podría hacer uso de una cirugía mínimamente invasiva de estos tejidos linfoides para el diagnóstico.

Existe un vacío en el comprender como el cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc} mata las neuronas. No se sabe si es debido a una pérdida de función o a una ganancia de una propiedad tóxica de la PrP^{Sc} (Kovacs and Budka, 2008), pero la presencia de PrP^C es necesaria para la neurodegeneración (Aguzzi 2009). Estudios recientes han sugerido que las formas más infecciosas de PrP^{Sc} serían las de tipo oligomérico, y que formas agregadas más grandes no serían más infecciosas ni más tóxicas. Cuando PrP^C se acumula en el citosol, se han observado fenómenos de neurodegeneración. Algunos consideran que la presencia de PrP^C en el citoplasma es el desencadenante, aunque otros creen que no. El dominio GPI también se ha relacionado con las prionopatías, ya que en modelos que expresan una forma truncada de la proteína a la que le falta

su dominio GPI, no se vieron signos de enfermedad, sugiriendo que los oligómeros de PrP y las fibras no son tóxicos de por sí (Brandner et al., 1996).

Descubrimiento y primeros casos

A mediados del siglo XVIII, una enfermedad que afectaba a ovejas y cabras de ganaderos europeos afloró sin causa aparente. Era la llamada *scrapie*, o “tembladera”, (Detwiler, 1992). Esta enfermedad se creyó que estaba causada por parásitos, pero cuando se demostró su capacidad infectiva, surgió la hipótesis de que podría estar causada por un virus (Wilson et al., 1950). La transmisión experimental del agente de ovejas a ratones, facilitó su investigación (Chandler, 1961). Una vez establecido el protocolo para obtener fracciones parcialmente purificadas del agente causante del *scrapie*, de cerebros de hámster, se pudo observar que aquellos procedimientos que modificaban o hidrolizaban proteínas, producían una disminución de la infectividad del agente (Prusiner et al., 1981, Prusiner et al., 1982). Además, no se pudo demostrar una relación entre la infectividad y la presencia de un polinucleótido (Riesner et al., 1993). Entonces no parecía plausible que la enfermedad fuera causada por un virus.

En el siglo XX, se produjo una alta incidencia de otra enfermedad, la ECJ, y se observó también una elevada incidencia de *Kuru*, otra enfermedad que afectaba a una población de Nueva Guinea, y que se había extendido por la población debido a la práctica del canibalismo. Las investigaciones de Gajdusek demostraron la transmisibilidad de estas enfermedades que parecían ser consecuencia de un “virus lento”, y que eran similares a la *scrapie* (Gajdusek, 1977).

El agente causante de estas enfermedades fue denominado “prión” por Stanley B. Prusiner en 1982, y se define como: “una partícula pequeña infecciosa de naturaleza proteica, resistente a procesos de inactivación que normalmente modifican ácidos nucleicos”, por el cual ganó un premio Nobel en 1997 (Prusiner, 1982). Hasta la fecha, se han publicado muchas evidencias dando apoyo a esta “hipótesis del prión” basada en que la transmisibilidad de estas enfermedades es debida a una única proteína, puesto que ya se había visto que los priones eran resistentes a algunos procesos de degradación proteica, y a nucleasas, pero que perdían su capacidad infectiva cuando eran tratados con agentes desnaturizantes de proteínas (Prusiner, 1991). Esto llevó a la búsqueda de la identidad de esta proteína, usando una de sus propiedades, la resistencia a la degradación por proteasas. Mediante la purificación de extractos de cerebros de hámster infectados con *scrapie*, se identificó un polipéptido de 27-30 kDa, que permitió la identificación de la proteína PrP^C, codificada por el genoma del huésped y no por la partícula infecciosa (Oesch et al., 1985, Basler et al., 1986). Este fragmento insoluble de 27-30 kDa se identificó como el fragmento resistente a proteasas de la proteína específica de la enfermedad, denominada PrP^{Sc} o también PrP^{res}.

La generación de animales sin PrP^C, reforzó la hipótesis de que una proteína era la única causante de las prionopatías, propuestas por Stanley Prusiner en 1982.

En resumen, podemos describir a los priones como agentes infecciosos que: i) no están codificados por una secuencia de ácidos nucleicos más larga de 50 bases (Riesner, 2004); ii) el único componente conocido del prión es una forma modificada de la PrP^C, codificada por el gen *PRNP* (Aguzzi and Calella, 2009); iii) el suceso central en las prionopatías, es la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, una isoforma insoluble y parcialmente resistente a proteasas, que se propaga imponiendo su conformación a otras moléculas de PrP^C (Aguzzi and Calella, 2009).

Conversión

Se desconoce si alguna forma de PrP^C podría actuar como sustrato para la formación de PrP^{Sc}, o si un pequeño subconjunto de moléculas de PrP^C son las precursoras de PrP^{Sc} (Weissmann, 1991), e incluso si podrían existir estadios transitorios entre las dos formas.

Varias evidencias experimentales sugieren que las moléculas susceptibles de convertirse en PrP^{Sc}, se escapan de la superficie celular antes de su conversión. El papel del dominio GPI también ha sido ampliamente estudiado por su implicación en la conversión. El laboratorio de Chesebro et al, estableció un modelo transgénico que expresa una forma de PrP^C sin su dominio GPI, llamada *anchorless* (Chesebro et al., 2005), y lo infectaron con PrP^{Sc}. Los ratones desarrollaron placas amiloides en el cerebro, pero prácticamente no mostraban síntomas clínicos.

Tanto PrP^C como PrP^{Sc} son codificadas por el gen *PRNP*, pero no pueden ser el resultado de un procesamiento de *splicing* alternativo del mRNA (Aguzzi and Calella, 2009), de modo que se establecieron dos modelos para explicar cómo se podía producir el cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc}:

- ✓ Modelo de re-plegamiento: este modelo constata la presencia de PrP^{Sc} en forma monomérica que sería más estable que PrP^C. El punto crítico para la conversión es la interacción entre las dos formas, que resulta en la formación de un heterodímero entre PrP^C y PrP^{Sc}, donde PrP^{Sc} induciría la transformación de PrP^C a PrP^{Sc}, actuando ésta como molde (Aguzzi and Calella, 2009). Este modelo es apoyado *in vitro* por evidencias que demuestran que una estructura rica en hélices alfa se puede convertir de forma espontánea en una estructura con un contenido mayoritariamente formado por hojas beta (Aranda-Anzaldo, 1992).
- ✓ Modelo de semilla o núcleo (*seeded nucleation*): este modelo, en cambio, sugiere que PrP^{Sc} existe en equilibrio termodinámico reversible con PrP^C, que en condiciones normales favorece a PrP^C. La conversión se produciría cuando PrP^{Sc} formara un agregado que serviría de semilla infecciosa o núcleo para reclutar más moléculas monoméricas de PrP^{Sc}, formando así un agregado amiloide, susceptible de fragmentarse en más núcleos que a su vez reclutarían más moléculas de PrP^{Sc} (Aguzzi and Calella, 2009).

En resumen, PrP^{Sc} necesita a PrP^C pero en su forma anclada a la membrana, y aunque el mecanismo de conversión se desconozca a ciencia cierta, parece bien establecido que PrP^C debe unirse a PrP^{Sc} formando un complejo intermedio durante la formación de la conformación patogénica.

Diferencias PrP^C-PrP^{Sc}

Intentos de identificar la presencia de modificaciones post-traduccionales que distinguieran las dos conformaciones, no han dado muchos frutos, aunque hay evidencias que parecen indicar que existen.

Los primeros estudios estructurales de las dos conformaciones, indicaban que la forma PrP^C era rica en hélices α , aproximadamente un 40% de la proteína, y presentaba relativamente pocas hojas β , concretamente 2 que representan un 3% de la proteína (Pan et al., 1993). Recientemente, se consiguió determinar la estructura de la proteína por RMN (Antonyuk et al., 2009), y se obtuvo su estructura cristalizada, estableciendo que la parte N-terminal de la proteína no estaba estructurada, mientras que la parte C-terminal está formada por 3 hélices α , y una hoja β antiparalela.

Sin embargo, debido a la insolubilidad y la formación de agregados con un grado de desorden, no se ha podido obtener la estructura cristalizada de PrP^{Sc} (Colby and Prusiner, 2011). El contenido de hojas beta de la forma PrP^{Sc} comprende un 40% de la proteína, mientras que las hélices alfa comprenden un 30%. Aunque de esta no se tiene una estructura de alta resolución, estudios de la zona resistente a proteasas que corresponde a PrP²⁷⁻³⁰, indican que esta isoforma es muy rica en hojas beta y que es capaz de convertirse en partículas en forma de bastoncillo con una estructura de tipo amiloide, formada por un 50% de hojas beta y un 20% de hélices alfa. En la figura 16 se pueden observar las características estructurales.

Ambas proteínas existen en tres estadios de glicosilación: no glicosilada, monoglicosilada o diglicosilada.

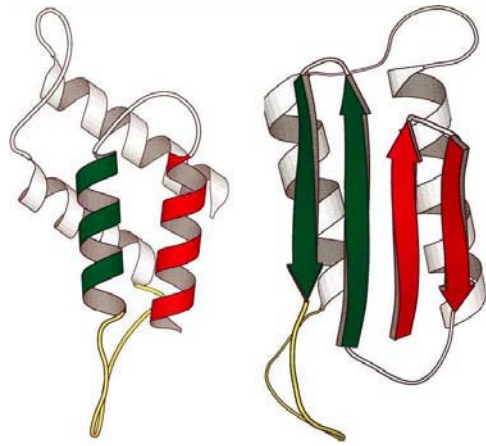


Figura 16. Diferencias estructurales entre PrP^C y PrP^{Sc}. Como vemos en la izquierda, la forma PrP^C es rica en hélices alfa, con un muy bajo porcentaje de láminas beta, a diferencia de la forma PrP^{Sc}, a la derecha, en la que el porcentaje de láminas beta es mayor.

2.2.2 Enfermedades priónicas en humanos

Las enfermedades priónicas se pueden clasificar en función del huésped, humano o no, y de su etiología: infecciosas, hereditarias o esporádicas, y pueden afectar a sujetos de distintos rangos de edad. Cursan con una gran variedad de síntomas motores o cognitivos. (Linden et al., 2008, Aguzzi and Calella, 2009).

A continuación se describen las que afectan a humanos:

Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) es la forma más común de prionopatía. Se puede clasificar en: esporádica (eECJ), familiar (fECJ), iatrogénica (iECJ) y existe también una variante llamada vECJ. La más común es la esporádica, corresponde a un 85% de los casos reconocidos. La ECJ familiar, en cambio, es hereditaria y es causada por mutaciones en el gen *PRNP*. Corresponde a entre un 5% y un 15% de los casos totales. Los casos por exposición a material infectado no llegan al 1%. Respecto a la forma variante de esta enfermedad, surgió hace unos 20 años, cuando más de 280.000 reses sufrieron EEB provocando una de las mayores crisis alimenticias a nivel mundial. Esta se transmitió a humanos, causando unos 200 casos de una variante de ECJ (vECJ). Aunque esta transferencia no ha sido demostrada, hay evidencias de que sí la hubo (Chazot et al., 1996, Will et al., 1996).

La etiología de la enfermedad en el tipo esporádico es desconocida, ya que los intentos de demostrar que era causada por una infección no han sido fructíferos. La incidencia es muy baja, aproximadamente 1 de cada millón de personas, pero ese número puede variar en función del seguimiento que se le haga a la enfermedad, llegando a ser de 3 entre un millón. Esta variación podría estar relacionada con la no detección de muchos de los casos que aparecen (Aguzzi and Calella, 2009).

Existen diferentes fenotipos de la enfermedad asociados a la presencia de 2 tipos predominantes de PrP^{Sc} que se diferencian en su movilidad electroforética después de un tratamiento con proteinasa K. Así podemos distinguir entre tipo 1 y tipo 2.

Los polimorfismos en el codón 129 del gen *PRNP*, modulan la sensibilidad a la enfermedad, siendo el homocigoto para el aminoácido metionina el que presenta un factor de riesgo mayor tanto para la enfermedad de tipo esporádico como para la variante.

Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

Esta enfermedad de origen hereditario, es producida por el cambio en el codón 102 de una prolina a una leucina en la secuencia que codifica para PrP^C, aunque se han identificado otras mutaciones. Afecta a 1 de cada 100 millones de individuos al año, aparece entre los 50 y los 60 años, aunque se han reportado casos en los que la enfermedad había empezado a los 25 años, con una progresión lenta, y se caracteriza por la presencia de ataxia cerebelar, pérdida de memoria, demencia, entre otros. También presentan placas amiloides inmunoreactivas a PrP (Collins et al., 2004, Alzualde et al., 2010b, Liberski, 2012). En 2010, el grupo del doctor López de Munain publicó un estudio describiendo una nueva mutación en el gen *PRNP*, Y218N, asociada con la enfermedad, en un paciente y otros dos miembros de la misma familia. El análisis neuropatológico de la paciente reveló depósitos de PrP^{Sc} y tau hiperfosforilada, entre otros (Alzualde et al., 2010a).

Insomnio familiar fatal (IFF)

El término Insomnio familiar fatal fue propuesto en 1986 para describir una enfermedad que involucraba a 5 miembros de una familia italiana. Es una enfermedad hereditaria causada por una mutación en el codón 178, por la sustitución de una asparagina por ácido aspártico (D178N), y que también está ligada a los polimorfismos del codón 129. La edad de aparición suele ser alrededor de los 50 años, con una esperanza de vida de pocos meses, entre 13 y 15. Se caracteriza por síntomas como el insomnio, anormalidades endocrinas, ataxia, disfagia, entre otros (Collins et al., 2004).

Kuru

Esta prionopatía llegó a ser la causa más común de muerte entre las mujeres de Papua Nueva Guinea, en la región Fore de las *Highlands*, pero este número disminuyó con el cese de los rituales de naturaleza caníbal. El propio nombre de la enfermedad, *Kuru*, que en aborigen significa temblor, define uno de los síntomas característicos de esta, junto con la ataxia cerebelar. Su desarrollo es lento, y el periodo de incubación es de unos 50 años. La presencia de una metionina en homocigosis en el codón 129 incrementa la susceptibilidad a la enfermedad (Collins et al., 2004, Liberski, 2013).

2.3 PrP^C y EA

2.3.1 PrP^{Sc} y EA

Muchas enfermedades neurodegenerativas como la EA, la enfermedad de Parkinson, la demencia frontotemporal o las prionopatías comparten ciertos rasgos neuropatológicos y moleculares. Se caracterizan por una pérdida progresiva de la función sináptica neuronal, que parece estar mediada por la toxicidad que presenta una determinada forma proteica que en condiciones fisiológicas no manifiestan, y que comparten propiedades similares de agregación y acumulación (Barnham et al., 2006).

Dos de estas patologías, la EA y las prionopatías, presentan características comunes, que han dado lugar al estudio de la posible interacción entre el depósito de A β y las funciones de PrP^C. Algunas de estas características se presentan a continuación:

- ✓ Existen, en las dos patologías, formas esporádicas y de origen genético.
- ✓ Se caracterizan a nivel inmunohistoquímico por una acumulación anormal de agregados de proteína en el cerebro: en el caso de las EETs se produce una acumulación de PrP^{Sc}, y en el caso de la EA una acumulación de Aβ y tau, que en ambos casos induce neurodegeneración en el SNC. Se han identificado placas amiloides en cerebros humanos con prionopatías que contienen PrP.
- ✓ Se ha demostrado la coexistencia de Aβ y PrP^{Sc} en cerebros afectados (Ferrer et al., 2001, Debatin et al., 2008), y se ha visto que PrP^C podría estar involucrada en el procesamiento de la APP, precursora de Aβ, y que podría participar en la eliminación de los oligómeros de Aβ (Griffiths et al., 2012).
- ✓ El modelo de semilla o *seeded nucleation*, descrito para PrP^C, también se podría aplicar a otras patologías basadas en la formación de agregados amiloides debido a un mal plegamiento de la proteína. Estos cambios conformacionales cambian la estructura de la proteína y resultan en formas ricas en hojas beta, parcialmente resistentes a proteólisis, que tienen mucha tendencia a la formación de agregados mayores. La formación de agregados amiloides se basa en la interacción de unidades monoméricas para formar un núcleo o semilla alrededor del cual se produce el agregado de mayor tamaño, aunque en el modelo de PrP^{Sc} es donde se ha conseguido probar esa infectividad (Aguzzi and Calella, 2009).
- ✓ Existen similitudes entre fragmentos clave de las secuencias de PrP^C y APP. Algunas de estas similitudes son: dominios conservados de histidina de unión a metales como cobre o zinc que juegan un papel importante en la biología de las dos proteínas; motivos transmembrana GxxxG; residuos de metionina como la Met35 en Aβ que modula su neurotoxicidad o la Met129 en PrP^{Sc} que modula la susceptibilidad a la enfermedad; y la posición de tirosinas conservadas. La interacción de Aβ con iones de zinc es importante para la formación de placas. Tanto APP como PrP^C interaccionan con iones de Cu²⁺, que se ha visto que afecta al procesamiento de APP mediado por α-secretasa. El cobre y el hierro inducen también agregación. En el caso de PrP^{Sc}, la ausencia de iones cobre o zinc la hacen altamente susceptible a degradación proteolítica (revisado en (Barnham et al., 2006)).
- ✓ Tanto APP como PrP^{Sc} contienen secuencias potencialmente tóxicas, que corresponden al péptido Aβ, y a la secuencia de aminoácidos 106-126, respectivamente. Estas dos secuencias están reguladas por mecanismos proteolíticos idénticos, llevados a cabo por enzimas de la misma familia, y están reguladas de forma parecida (Checler and Vincent, 2002).
- ✓ Ambos fragmentos peptídicos, Aβ o 106-126, potencian la activación de caspasa 3, efectora de la vía apoptótica, dando lugar a fenotipos apoptóticos similares, en los que está involucrada la homeostasis del calcio (Saez-Valero, 2000)(White, 2001).
- ✓ Las dos proteínas se procesan de forma similar después de su traducción, y comparten la existencia de una vía no amiloidogénica alternativa a su procesamiento, que actúa sobre las secuencias correspondientes al dominio Aβ, impidiendo así su formación, y en el caso de PrP^C, en la secuencia 106-126, concretamente entre las His111 y Met112, dando lugar a la formación de un producto llamado "C1"(Barnham et al., 2006). Tanto ADAM10 como ADAM17 parecen estar involucradas en este proceso proteolítico no amiloidogénico de las dos proteínas.

2.3.2 PrP^C y EA

Las características comunes mencionadas anteriormente entre la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades priónicas, ha aumentado el número de estudios que tienen como objetivo determinar la posible interacción entre el depósito y la señalización inducida por A β y las funciones de PrP^C (Nicolas et al., 2009), así como su posible papel en la EA. Además, un meta-análisis de asociación genética con la EA reveló al gen *PRNP* como un gen asociado a una mayor susceptibilidad a la enfermedad (revisado en (Bertram and Tanzi, 2008)), dando mayores evidencias para su estudio.

En el panorama científico reciente, han aparecido varios estudios en los que se relaciona a PrP^C con la EA. Por una parte, se le ha atribuido a PrP^C un papel modulador indirecto de A β , puesto que modula su síntesis, pero por otra parte se cree que PrP^C podría ser un receptor directo de A β , pudiendo tener entonces dos roles, uno de tipo protector o por el contrario otro en el que participaría de la toxicidad inducida por el péptido A β siendo receptor de los oligómeros de A β . Este es uno de los puntos de debate hoy en día, debido a la discrepancia entre los diferentes resultados publicados. Estas discrepancias nacen, probablemente, de la gran diversidad de modelos disponibles para estudiar la enfermedad, y de la heterogeneidad de la población oligomérica de A β . En el caso de los oligómeros sintéticos, la heterogeneidad de los protocolos de preparación de estos, puede ser la base de muchas de las desconformidades publicadas. En todos los artículos en los que se han usado oligómeros sintéticos, se ha demostrado que estos se unen a PrP^C, pero se desconoce porqué en algunos casos sus efectos tóxicos dependen de PrP^C y en otros no (e.g. (Calella et al., 2010, Gimbel et al., 2010)). A continuación se resumen algunos de los resultados obtenidos hasta la fecha:

- ✓ Se ha demostrado que PrP^C jugaría un papel en el procesamiento de A β , interaccionando directamente con BACE1, inhibiendo su procesamiento proteolítico y reduciendo entonces la formación de péptidos A β . PrP^C modularía la actividad BACE1 sobre la proteína APP_{WT} siendo un regulador negativo de la producción de A β (Parkin et al., 2007), ya que no se ha observado que pueda hacerlo en la proteína APP con la mutación *Swedish* (Griffiths et al., 2011).
- ✓ Se han caracterizado los dominios de la proteína responsables de esta modulación, en los que vieron que este efecto desaparecía en moléculas que no tenían la secuencia N-terminal del aminoácido 2 al 26, previamente asociados con la endocitosis de PrP^C (Sunyach et al., 2003). Además, la eliminación del anclaje GPI o el anclaje de PrP^C a la membrana mediante un dominio transmembrana, bloquearon también este efecto, sugiriendo entonces que la endocitosis mediada por esta secuencia y su localización en dominios específicos de la membrana, son necesarios para la inhibición del procesamiento mediado por BACE1 (Linden et al., 2008).
- ✓ Se ha demostrado una unión entre los diferentes alelos del gen *PRNP* con la EA, habiendo una posible correlación entre los polimorfismos en el codón 129 con el riesgo de la enfermedad o el deterioro cognitivo. Varios estudios han publicado que no hay asociación entre el polimorfismo en el codón 129 y el riesgo de EA en pacientes esporádicos de algunas zonas (Combarros et al., 2000, Ohkubo et al., 2003), mientras que en otros como en Alemania o Polonia, los pacientes que presentaban dos valinas en homocigosis presentaban un mayor riesgo de aparición temprana de la enfermedad, comparado con los heterocigotos. Los que presentaban al menos una valina en uno de los alelos, mostraban una pequeña aceleración en el deterioro cognitivo en comparación con los portadores de metionina (Dermaut et al., 2003, Golanska et al., 2004). La presencia de valina en el codón 129 también correlaciona con la presencia y la densidad de

lesiones asociadas a $A\beta$. Esto sugiere que los efectos neuroprotectores mediados por PrP^C son menos efectivos cuando la proteína tiene una Valina en el codón 129.

- ✓ Los efectos de este codón en la actividad BACE1 también se probaron en animales en los que la proteína endógena se había sustituido por la proteína humana, viéndose una cantidad similar de $A\beta_{42}$ tanto en los homocigotos por valina como en metionina, mientras que los niveles de $A\beta_{40}$ eran un poco superiores en los homocigotos por metionina. En ratones KO *Edinbrugh*, los niveles de $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$ eran significativamente mayores que en los WT (Parkin et al., 2007).
- ✓ Se ha demostrado la interacción directa entre $A\beta$ y PrP^C , sugiriendo que PrP^C podría ser un receptor de las formas solubles del péptido amiloide, puesto que interacciona con elevada afinidad con los oligómeros de $A\beta$, actuando así de mediador de sus cascadas de señalización tóxicas. PrP^C es capaz de unirse a los oligómeros en concentraciones nanomolares de éstos, es decir con una elevada afinidad, y de forma específica, ya que no se ha detectado unión ni a fibras ni a monómeros de $A\beta$. También proponían que PrP^C era un mediador de la disfunción sináptica inducida por los oligómeros de $A\beta$ y del depósito de $A\beta$. Sin embargo, en este estudio no se relacionaba si esta interacción de PrP^C con $A\beta$ afecta a la fosforilación de tau (Lauren et al., 2009). En la figura 17 se puede ver de forma esquemática lo que propone esta publicación.

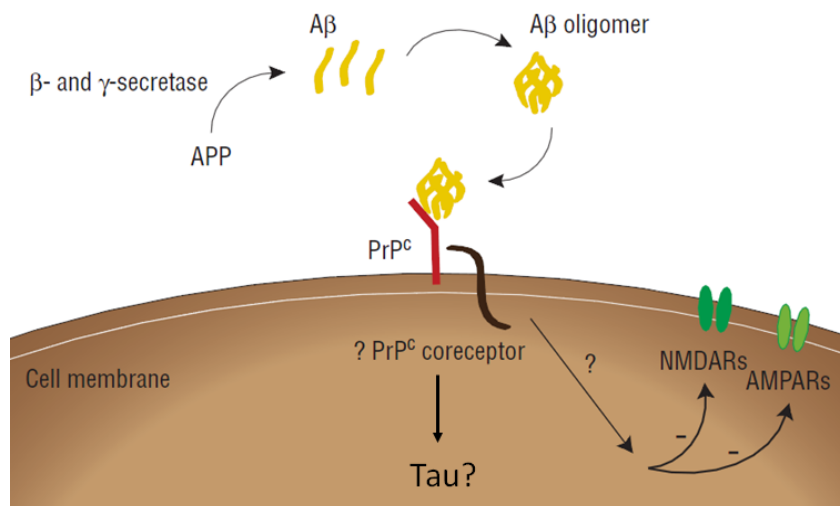


Figura 17. Modelo de señalización propuesto por Lauren, S et al. En este modelo, PrP^C actuaría de receptor de los oligómeros de $A\beta$ mediando sus efectos tóxicos y la señalización intracelular que mediaría también los cambios patológicos de tau. Adaptado de Nygaard, HB., 2009.

- ✓ Estos datos fueron corroborados en fragmentos de hipocampo de animales KO para PrP^C , quedaban soporte a esta teoría, ya que estos animales mostraban ser resistentes a la supresión de la LTP mediada por los oligómeros de $A\beta$ (Lauren et al., 2009). En otro estudio donde cruzaron estos animales con un modelo de la EA, los resultados muestran que PrP^C es necesario tanto para el deterioro cognitivo como para el tiempo de supervivencia, aunque la presencia de PrP^C no tenía ninguna influencia en la formación de las placas en el cerebro (Gimbel et al., 2010).

La demostración de la interacción directa entre $A\beta$ y PrP^C motivó un gran número de publicaciones en las que se han confirmado estos resultados, pero también han aparecido resultados opuestos. Estudios como el de Bate et al., (Bate and Williams, 2011) demuestran que PrP^C juega un papel esencial en las alteraciones de la plasticidad sináptica inducidas por los oligómeros, y otros han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, que el uso de anticuerpos anti PrP^C , reduce estos efectos

(Chung et al., 2010, Barry et al., 2011, Freir et al., 2011). En cambio, en otro trabajo en el que inyectaban oligómeros sintéticos intraventricularmente en ratones, PrP^C no tenía ningún papel en la LTP (Balducci et al., 2010). Otros autores demostraron que la presencia o ausencia de PrP^C no tenía ningún efecto en la inhibición de la LTP inducida por A β en rebanadas de cerebro (Callella et al., 2010), o en la memoria y el aprendizaje en ratones transgénicos para APP (Cisse et al., 2011). Otro grupo, usando como modelo cultivos de organotípicos, vio que PrP^C no era necesaria para los efectos tóxicos en las sinapsis mediados por los oligómeros de A β (Kessels et al., 2010).

Un trabajo enfocado en la interacción de A β con PrP^C, mostró que PrP^C contiene dos sitios de unión a los oligómeros de A β , uno entre los residuos 95 y 105, que ya había sido identificado por Lauren et al (Lauren et al., 2009), y el otro entre los residuos 23 y 27 (Chen et al., 2010). Estos dos sitios coinciden o están próximos a regiones de PrP^C que determinan su actividad, su endocitosis o están relacionados con su toxicidad. De hecho se ha visto que los oligómeros de A β pueden afectar a la localización de PrP^C incrementando la formación de clústers de PrP^C en la superficie celular (Caetano et al., 2011). Entonces, los mismos dominios estructurales de la proteína que gobiernan su función, el tráfico celular y la toxicidad, son los que se unen a los oligómeros.

Un estudio más reciente aporta evidencias de que PrP^C puede actuar de mediador de la toxicidad de otras proteínas ricas en láminas beta (Resenberger et al., 2011). Entonces, PrP^C se uniría a las conformaciones oligoméricas de diferentes proteínas, las cuales podrían bloquear, potenciar o sabotear las funciones normales de esta.

El debate acerca de si la naturaleza del papel que PrP^C juega en la enfermedad sigue vigente hoy en día. Esta tesis supone una nueva aproximación para aportar datos acerca del papel concreto de esta proteína en el depósito de tau.

3. Péptidos con capacidad de penetrar la membrana celular

3.1 Descripción general

El desarrollo de fármacos constituye un proceso largo formado por multitud de pasos, donde uno de los más importantes es el reconocimiento específico de la diana para la que el fármaco ha estado diseñado. Otras propiedades a tener en cuenta son la estabilidad, la eliminación o la administración. Estos conceptos son especialmente importantes cuando se trata de dianas intracelulares.

Existen en el mercado una gran variedad de compuestos peptídicos terapéuticos, y el número de nuevos péptidos que entran en ensayos clínicos es de unos 16 de media por año (datos obtenidos entre los años 2000 y 2008). Por desgracia, estos péptidos disponibles no tienen como diana terapéutica una proteína intracelular, limitando entonces su potencial terapéutico.

En las últimas décadas, una de las estrategias más utilizadas en el área de administración de fármacos para superar esta barrera, ha sido la conjugación de compuestos con moléculas capaces de atravesar las membranas celulares. Los péptidos capaces de penetrar la membrana celular, o CPPs, del inglés *cell penetrating peptides*, son secuencias cortas de entre 5 y 30 aminoácidos que se pueden translocar a través de la membrana plasmática mediante mecanismos dependientes y/o independientes de energía. Pueden unirse a otras moléculas mediante enlaces químicos vía uniones covalentes o interacciones no covalentes, como ácidos nucleicos, polipéptidos, nanopartículas o liposomas, algunas de ellas con un peso muy superior al del propio CPP. Los CPPs facilitan el transporte de éstas a través de la membrana, siendo entonces una prometedora herramienta para la administración de fármacos y terapia génica (Sheng et al., 2009).

Los CPPs no exhiben, en general, una homología de secuencia. Presentan una gran variedad de estructuras y secuencias pero mantienen unas características generales para su correcta translocación a través de la membrana, con ejemplos como un i) elevado número de residuos básicos cargados positivamente como lisinas y argininas que les proporciona un carácter catiónico, ii) secuencias aniónicas y iii) secuencias neutras, mostrando entonces diferentes grados de hidrofobicidad y polaridad que les confiere un carácter anfipático (revisado en (Milletti, 2012)). Aunque mayoritariamente el mecanismo de internalización se desconoce, posibles mecanismos podrían ser la endocitosis mediada por clatrina o mediada por unión a microdominios de membrana como las balsas lipídicas, la macropinocitosis, la translocación directa a través de la membrana, o la formación de un poro en la misma (Sheng et al., 2009).

Uno de los primeros CPPs descritos fue el péptido Tat, derivado de la proteína Tat (Frankel and Pabo, 1988), transactivador de la transcripción génica, en 1988 por Frankel y Green, encontrado en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La proteína es capaz de penetrar en células de mamífero en cultivo, y promover la expresión genética del virus (Frankel and Pabo, 1988, Vives et al., 1997). En la búsqueda para encontrar cuál era la secuencia de aminoácidos mínimamente necesaria para su entrada, se identificó el péptido Tat (48-60) que formaba parte del dominio básico de la proteína (Green et al., 1989).

Desde entonces, el número de CPPs se ha expandido considerablemente. Esto ha llevado al estudio de estos péptidos como herramientas de administración de fármacos, utilizándolos como si fueran transportadores. Las tres áreas principales de estudio son: i) el uso de los CPPs como transportadores de macromoléculas; ii) definir las bases estructurales que definen su capacidad de internalización; iii) conocer el mecanismo de entrada a la célula. Algunos ejemplos de CPP mejor

estudiados son: AntP, también conocido como penetratina; Vp22, poliargininas (R9) (Bechara and Sagan, 2013).

Actualmente, un pequeño número de CPPs se encuentran en estudios clínicos. Algunos ejemplos son: AZX100 (cicatrices queloides, fase II); RT001 (arrugas cutáneas, fase II); KAI-9803 (infarto de miocardio, fase II), entre otros (Milletti, 2012).

3.1.1 Clasificación

Atendiendo a su origen, los CPPs se pueden clasificar en 3 clases: i) los derivados de proteínas, ii) péptidos quiméricos formados por la fusión de 2 secuencias “naturales”, y iii) péptidos sintéticos que se han diseñado basando su estructura en estudios previos de actividad y estructura (Bechara and Sagan, 2013).

Otra forma de clasificar los CPPs es mediante sus características físico-químicas. Así encontramos tres grandes clases: catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos. Del total, aproximadamente un 83% tienen una carga positiva neta, mientras que los anfipáticos que engloban los catiónicos y los aniónicos, corresponden a un 44%. La clase menos representada es la de los hidrofóbicos, que representa solo un 15% del total. A continuación se describen estos tres tipos (ver (Milletti, 2012) para revisión):

✓ CPPs catiónicos: presentan una carga neta positiva, así como algunos aminoácidos de tipo ácido en la secuencia. El primer CPP descubierto, Tat, era catiónico. Varios estudios sugieren que se necesitan como mínimo 8 cargas positivas para una internalización efectiva de estos CPPs. Estudios con péptidos basados en una secuencia de argininas han demostrado que el número mínimo de argininas necesarias para una buena entrada son 8.

Un caso especial de CPPs catiónicos son las secuencias de localización nuclear (NLSs). Los NLSs son secuencias peptídicas basadas en motivos ricos en lisina, arginina o prolina, que se pueden transportar al núcleo a través de poros nucleares, aunque el número de cargas positivas es menor a 8, no siendo entonces unos buenos CPPs, pero se pueden unir a una secuencia peptídica más hidrofóbica para obtener un CPP anfipático con una buena internalización.

✓ CPPs anfipáticos: son aquellos que contienen tanto regiones polares como regiones apolares. La mayoría de estos péptidos son catiónicos. Algunos ejemplos son el MPG o la penetratina. Concretamente, el MPG corresponde a un tipo de péptido quimérico formado por una secuencia de localización nuclear unida a un dominio hidrofóbico.

Algunos CPPs anfipáticos contienen un motivo estructural como una hélice α anfipática. En esta hélice podemos encontrar una zona hidrofílica y otra hidrofóbica. También hay péptidos que en cambio tienen una hoja beta en su estructura.

Otra clase de CPPs anfipáticos son los péptidos ricos en prolina, que son capaces de ser internalizados por células eucariotas (Sadler et al., 2002, Fernandez-Carneado et al., 2004). Este tipo de CPP se explicará en detalle en el siguiente apartado (3.2).

✓ CPPs hidrofóbicos: se podrían considerar aquellos en los que su secuencia presenta únicamente residuos apolares, tienen una carga neta baja, o tienen un motivo hidrofóbico crucial para su internalización. También podemos encontrar aminoácidos hidrofóbicos en otro tipo de CPPs, los anfipáticos. Hasta la fecha se ha encontrado un reducido número de CPPs de este tipo.

3.1.2 Ventajas e inconvenientes

Los CPPs ofrecen algunas ventajas con referencia a otros sistemas. La translocación a través de la membrana se realiza con una baja toxicidad pero con elevada eficiencia en varias líneas celulares.

Como agentes terapéuticos, presentan una elevada especificidad, disminuyendo así la interacción con otras moléculas y la probabilidad de aparición de efectos secundarios. También presentan una baja toxicidad por su baja acumulación en tejidos y la no generación de metabolitos secundarios (Vlieghe and Khrestchatisky, 2010, Bechara and Sagan, 2013).

Por el contrario, también tienen limitaciones puesto que muestran una baja biodisponibilidad, probablemente debido a una baja resistencia frente a proteasas, y una alta sensibilidad a degradación enzimática por su falta de estructura terciaria. Además, debido a su internalización, pueden quedarse estancados en los endosomas, siendo degradados rápidamente en estas mismas estructuras sin poder llegar a su diana en el citosol (Milletti, 2012). En el terreno económico, los CPPs no ofrecen una mayor ventaja ya que su coste de síntesis es elevado y su vida media es corta.

Con el fin de mejorar las características de los CPPs y hacerlos más viables en el terreno terapéutico, se ha desarrollado un tipo de oligómeros llamados foldámeros que mimetizan péptidos naturales, en busca de nuevas estructuras que faciliten la entrada a la célula. Un tipo importante de foldámeros son los de tipo peptídico, y algunos ejemplos son los β -péptidos, los γ -péptidos o péptidos con D-aminoácidos en su secuencia (Farrera-Sinfreu et al., 2004).

3.2 Librerías de compuestos singulares: γ -péptidos derivados de prolina

3.2.1 Descripción

El desarrollo de nuevas estrategias de síntesis de péptidos de fase sólida cada vez más poderosas, ha permitido la obtención más rápida y eficiente de moléculas con una mayor complejidad estructural, pudiendo construir un esqueleto común susceptible de ser funcionalizado. Estas innovaciones han permitido entonces sintetizar un tipo de CPPs muy interesantes, los llamados péptidos ricos en prolina con una estructura rica en residuos de prolina (Milletti, 2012).

Estos péptidos son una familia estructural y químicamente diversa que se caracteriza por la presencia de anillos pirrolidínicos de las prolinas (Pujals and Giralt, 2008). La prolina posee un conjunto de características únicas con respecto a los otros aminoácidos “naturales”, como la rigidez que aporta a la estructura del péptido gracias a este anillo pirrolidínico, o la elevada solubilidad en el agua de los péptidos ricos en prolina (Farrera-Sinfreu et al., 2005).

Un gran número de péptidos ricos en prolina lineales han sido diseñados y evaluados como CPPs. Los primeros se diseñaron usando aminoácidos naturales, pero más tarde aparecieron otros más sofisticados. Un ejemplo son los CPPs diseñados a partir de la bactericina-7 (Bac7), que se usó como molde para su diseño, obteniendo CPPs capaces de entrar en la célula (Pujals and Giralt, 2008).

Otra familia de péptidos ricos en prolina son los γ -péptidos no naturales derivados de prolina (Pujals and Giralt, 2008), sintetizados a partir del monómero cíclico *cis*- γ -amino-L-prolina. Estos péptidos pueden ser funcionalizados en los grupos α -amino de cada monómero de prolina con diferentes grupos que mimetizan cadenas laterales de aminoácidos naturales, para obtener características hidrofóbicas, hidrofílicas o anfipáticas, y conferirles así propiedades como la capacidad de atravesar la membrana celular. Esta funcionalización permite también la unión covalente de un fármaco (Farrera-Sinfreu et al., 2005).

3.2.2 Aplicaciones

El grupo de la doctora Royo, de la Unidad de Química Combinatoria del Parque Científico de Barcelona lleva tiempo trabajando con este tipo de péptidos ricos en prolina, mejorando su estrategia de síntesis para, a su vez mejorar sus capacidades de internalización. Estudios previos realizados por su grupo han demostrado la internalización de algunos de estos péptidos en líneas celulares como Cos-1 o HeLa, permitiendo así encontrar buenos CPPs con una buena eficiencia de internalización mediante un mecanismo endocítico, sin inducir toxicidad a la célula, incluso a altas concentraciones, y que además presentaban estabilidad frente a la proteólisis enzimática y en general buena solubilidad, características que los hacen buenos candidatos para ser transportadores de moléculas terapéuticas (Farrera-Sinfreu et al., 2005).

En ese sentido, se realizaron pruebas para evaluar la posibilidad de que estos γ -péptidos pudieran tener actividad anti-leishmania, puesto que otros tipos de γ -péptidos presentaban esta característica. La resistencia a fármacos que el parásito de esta enfermedad ha desarrollado, ha hecho crecer la necesidad de desarrollar nuevos compuestos. Aunque los péptidos testados no exhibieron este tipo de actividad, sí quedó demostrada su capacidad para atravesar la membrana del parásito sin formar poros, abriendo así un abanico de posibilidades en los que utilizar estos γ -péptidos como transportadores de nuevos compuestos. El grupo también evaluó su capacidad microbicida, observando un posible uso como antimaláricos (Carbajo, 2012).

Adicionalmente, el grupo también estudió la capacidad de estos péptidos para penetrar una de las barreras biológicas más importantes, la barrera hematoencefálica (BHE) (Pulido, 2014). La BHE es una formación de células endoteliales que recubren los capilares del cerebro y lo protegen pero a la vez permiten el paso de nutrientes, manteniendo un equilibrio óptimo para el cerebro. En la industria farmacéutica, el uso de modelos *in vivo* como los ratones modificados genéticamente, para determinar si un fármaco atraviesa o no esta barrera es muy importante. Estudios realizados con técnicas de escaneo como el PET permiten hacer un seguimiento de estos compuestos a tiempo real, siempre y cuando estos lleven unido un fluorocromo. La desventaja que presenta este tipo de modelos es su elevado coste tanto de la técnica como la obtención del modelo.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, se ha convertido en los últimos años en un modelo atractivo *in vivo* para estudios de alto rendimiento de cribaje (*screening*) farmacéutico para evaluar su capacidad de atravesar la BHE. A nivel estructural, la barrera de este modelo comparte algunas características con la barrera de los vertebrados, así como cierta homología en proteínas importantes en la función de la barrera. Otra ventaja atractiva de este modelo es la posibilidad de marcar de forma fluorescente la BHE, facilitando el estudio farmacológico de los péptidos con capacidad para penetrar en ella. Algunos de los péptidos estudiados fueron capaces de atravesar la barrera (Pulido, 2014).

Animados por estos resultados, nuestro grupo quiso seguir indagando en el uso de éstos péptidos como potenciales tratamientos en regeneración axonal y enfermedades neurodegenerativas, en los que se necesita que el tratamiento atraviese la BHE. En esta tesis, se ha realizado la evaluación de una quimiolibrería formada por 50 γ -péptidos sintetizados mediante la estrategia Fmoc/Boc, a partir del monómero *cis*- γ -amino-L-prolina. La estructura de los péptidos utilizados se puede encontrar en la tesis doctoral de un miembro del grupo de la doctora Royo (Carbajo, 2012), aunque en la figura 18, está representada la estructura general de los péptidos. Estos péptidos pueden podrían ser utilizados como herramienta terapéutica con posibles aplicaciones en el campo de las enfermedades neurodegenerativas.

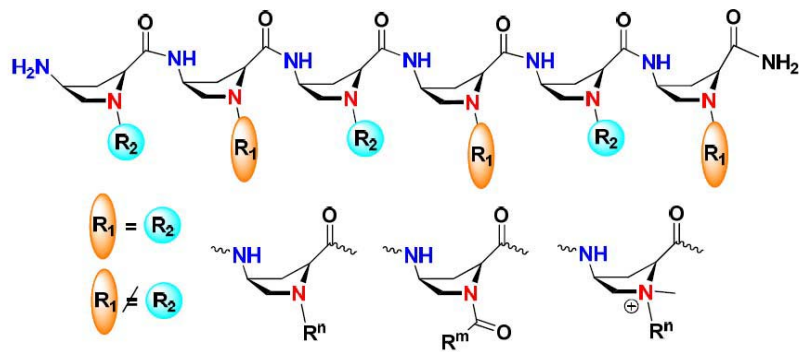


Figura 18. Estructura general de los γ -péptidos derivados de prolina. Estos péptidos están formados a partir del monómero *cis*- γ -amino-*L*-prolina, aportando rigidez a la estructura. Tomado de la tesis doctoral de Daniel Carbajo, 2012.

OBJETIVOS

La enfermedad de Alzheimer se está abriendo paso entre las enfermedades con más incidencia en el mundo. Ya se considera la forma más común de demencia y el número de casos aumenta día tras día, convirtiéndose tanto en un problema social como económico. Eso ha llevado a que la comunidad científica dedique cada vez más esfuerzos en conocer mejor esta patología y en encontrar una posible terapia efectiva. Desde su descubrimiento en 1906 hasta el día de hoy, se ha producido una gran mejora tanto en técnicas microscópicas como de neuroimagen que han facilitado mucho su estudio y diagnóstico.

Por otra parte, el estudio de la proteína priónica celular y en especial sus funciones, ha sido uno de los temas centrales en el panorama científico reciente. Desde su descubrimiento por Stanley B. Prusiner como agente proteico causante de las enfermedades priónicas, a esta proteína se le han atribuido una gran variedad de funciones, aunque uno de los hallazgos más recientes ha sido la posible conexión entre ésta y la EA.

Parkin et al., publicaron en 2007 la intervención de PrP^C en la producción del péptido beta amiloide, por su interacción con BACE1, proteasa implicada en el procesamiento de APP. Más recientemente, otro estudio publicado en 2009 por el grupo de SM Strittmatter afirmaba que PrP^C interacciona con los oligómeros de A β , pudiendo ser un receptor específico de alta afinidad y un mediador de la señalización inducida por éstos. Este hecho ha sido corroborado por algunos estudios pero contradicho por otros, probablemente debido a la alta heterogeneidad que existe tanto en los modelos animales como en los protocolos de obtención de los ADDLs utilizados en los diferentes laboratorios.

Estudios previos realizados en nuestro grupo indican que la agregación de PrP^C en la superficie neuronal mediante el uso del anticuerpo SAF61, activa la vía de Fyn y otras cinasas intracelulares *in vitro*, iniciando así una cascada de señalización que induce la fosforilación de tau en el epítipo tirosina 18, un epítipo que también se encuentra fosforilado en pacientes de EA. Tau es una proteína asociada a microtúbulos que promueve su estabilización y polimerización en condiciones fisiológicas, y en un estado de fosforilación que depende del balance entre diferentes cinasas y fosfatasas. Un desequilibrio de este sistema, causa la hiperfosforilación de la proteína impidiendo su unión a los microtúbulos y por ende su estabilización, ya que se agrega en forma de ovillos. Sin embargo, no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo por el que los oligómeros de A β provocan este desequilibrio que resulta en la agregación de tau.

Por último, debido a que los tratamientos aprobados actualmente no mejoran ni frenan la enfermedad de forma permanente, han surgido una gran multitud de alternativas con el objetivo de buscar terapias más efectivas para la enfermedad, que se basan, por ejemplo, en la inmunoterapia o la modulación de complejos enzimáticos relacionados con la generación del péptido amiloide. Una problemática añadida, está relacionada con la administración de estos tratamientos, concretamente con el estadio de aplicación de la terapia. En esta enfermedad en la que la degeneración empieza en un punto muy anterior al momento en el que el paciente empieza a mostrar síntomas, es muy importante poder proporcionar el tratamiento antes de que el daño sea irreversible. Estudios enfocados en detectar cambios sutiles en biomarcadores u otras moléculas susceptibles de padecer cambios en esos estadios iniciales serán de una gran ayuda para prevenir la enfermedad o evitar incluso su aparición.

Los péptidos capaces de penetrar la membrana plasmática, e incluso la barrera hematoencefálica, han ido cobrando protagonismo en el terreno clínico, por su uso como transportadores, aunque su potencial intrínseco como fármaco no ha sido muy estudiado.

En base a estos antecedentes, la finalidad principal de esta tesis es **el estudio del papel de la proteína priónica celular en la enfermedad de Alzheimer y la caracterización de una librería de γ -péptidos para encontrar un posible tratamiento.**

Para llevar a cabo este estudio se plantearon los objetivos que se exponen a continuación:

- Objetivo 1. **Caracterizar el papel de PrP^C en la fosforilación de tau inducida por los oligómeros de A β *in vitro*** en cultivos procedentes de animales *knockout* para PrP^C o tg20, así como también en cultivos, procedentes de animales WT, con la expresión de la proteína silenciada mediante el uso de lentivirus.
- Objetivo 2. **Caracterizar el papel de PrP^C en la acumulación de A β** en el modelo triple transgénico APP/PS1/Prnp^{0/0} y APP/PS1/Tg20.
- Objetivo 3. **Determinar el papel de PrP^C en la capacidad infectiva del prion** en animales triples transgénicos inoculados con dos cepas priónicas adaptadas a ratón, y expresión de diferentes dosis de PrP^C.
- Objetivo 4. **Analizar el perfil de expresión de PrP^C *in vivo*** en muestras de pacientes de Alzheimer del estadio I al VI, en los diferentes estadios de la enfermedad, y del modelo murino APP/PS1 a diferentes edades.
- Objetivo 5. **Screening de una librería de γ -péptidos derivados de prolina** para evaluar su posible uso como tratamiento para el Alzheimer.

RESULTADOS

La presente tesis se basa en dos publicaciones realizadas durante el periodo de doctorado, Capítulo 1 y Capítulo 2, junto con un tercer Capítulo de resultados no publicados.

Capítulo 1

Cellular prion protein modulates β -amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice.

Ordóñez-Gutiérrez L, Torres JM, Gavín R, Antón M, Arroba-Espinosa AI, Espinosa JC, Vergara C, Del Río JA, Wandosell F.

Neurobiol Aging. 2013 Dec; 34(12):2793-804. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.019. Epub 2013 Jul 4.

Referencia: (Ordóñez-Gutiérrez et al., 2013)Ordóñez-Gutiérrez, L., J. M. Torres, R. Gavín, M. Anton, A. I. Arroba-Espinosa, J. C. Espinosa, C. Vergara, J. A. Del Río, and F. Wandosell. "Cellular Prion Protein Modulates Beta-Amyloid Deposition in Aged App/Ps1 Transgenic Mice.". *Neurobiol Aging* 34, no. 12 (Dec 2013): 2793-804.

Capítulo 2

Role of PrP^C Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution.

Vergara C, Ordóñez-Gutiérrez L, Wandosell F, Ferrer I, Del Río JA, Gavín R.

Mol Neurobiol. 2014 Jun 26. [Epub ahead of print].

Referencia: (Vergara et al., 2014)Vergara, C., L. Ordóñez-Gutiérrez, F. Wandosell, I. Ferrer, J. A. Del Río, and R. Gavín. "Role of Prp Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution." *Mol Neurobiol* (Jun 26 2014).

Capítulo 3

Molecular screening of a Cell-Penetrating *cis*- α -Amino-L-Proline-Derived Peptides library as inhibitors of A β production

Cristina Vergara^{1,2,3}, Patricia Carulla^{1,2,3}, Daniel Carbajo⁴, Fernando Albericio⁵, Isidre Ferrer⁶, Miriam Royo⁴, Rosalina Gavín^{1,2,3}, José Antonio Del Río^{1,2,3}

En preparación.

Capítulo 1:

Cellular prion protein modulates β -amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice

Ordóñez-Gutiérrez L, Torres JM, Gavín R, Antón M, Arroba-Espinosa AI, Espinosa JC, Vergara C, Del Río JA, Wandosell F

Resumen:

La agregación de proteínas mal plegadas es una característica común en la enfermedad de Alzheimer y las prionopatías. En la EA, se produce una agregación de A β y tau hiperfosforilada, y en las prionopatías, una agregación de la proteína piónica celular (PrP^C) en su conformación aberrante llamada PrP^{Sc}. Recientemente, se ha vinculado la PrP^C con el Alzheimer, viéndose una interacción directa entre los oligómeros de A β y PrP^C. Se ha propuesto también que PrP^C participa en la supresión de la plasticidad sináptica inducida por los oligómeros, poniendo en el punto de mira a esta proteína como una posible diana terapéutica.

En colaboración con el laboratorio de Francisco Wandosell, en esta publicación se ha estudiado el papel del procesamiento y la acumulación del péptido A β en la infectividad del prión, así como el efecto de la carga proteica de PrP^C en el depósito de A β .

Utilizando animales APP/PS1 inoculados con diferentes cepas de prión, hemos observado que la infectividad del prión no se veía afectada por este genotipo, puesto que los niveles de supervivencia no variaban de forma significativa, ni tampoco por la presencia de A β o por sus depósitos.

El uso de animales transgénicos con diferente carga génica de PrP^C, nos ha permitido ver que la acumulación de los péptidos de A β en placas seniles estaba directamente correlacionada con la expresión de PrP^C en animales de mayor edad, siendo su densidad más elevada en aquellos animales sobreexpresantes de PrP^C, a diferencia de los animales KO para la proteína.

Por último, animales APP/PS1 triple transgénicos con diferente carga génica de PrP^C, nos ha permitido ver que una sobreexpresión de la proteína causaba un aumento de fosforilación en uno de los primeros epítomos que están fosforilados también en la enfermedad independientemente del genotipo APP/PS1.

Estos resultados confirman que PrP^C está relacionada con el metabolismo de la proteína APP, precursora de A β , y sugiere que el depósito del péptido A β está modulado de forma patológica por PrP^C.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neurobiology of Aging

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuaging

Cellular prion protein modulates β -amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice

Lara Ordóñez-Gutiérrez^{a,b}, Juan María Torres^c, Rosalina Gavín^{b,d,e}, Marta Antón^{a,b}, Ana Isabel Arroba-Espinosa^c, Juan-Carlos Espinosa^c, Cristina Vergara^{b,d,e}, José A. del Río^{b,d,e}, Francisco Wandosell^{a,b,*}

^a Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

^c Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Valdeolmos, Madrid, Spain

^d Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, Spain

^e Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2012

Received in revised form 16 May 2013

Accepted 23 May 2013

Available online 4 July 2013

Keywords:

Neurodegeneration

Aging

Amyloid

Prion

Signaling

ABSTRACT

Alzheimer's disease and prion diseases are neuropathological disorders that are caused by abnormal processing and aggregation of amyloid and prion proteins. Interactions between amyloid precursor protein (APP) and PrP^c proteins have been described at the neuron level. Accordingly to this putative interaction, we investigated whether β -amyloid accumulation may affect prion infectivity and, conversely, whether different amounts of PrP may affect β -amyloid accumulation. For this purpose, we used the APP^{Swe}/PS1^{dE9} mouse line, a common model of Alzheimer's disease, crossed with mice that either overexpress (Tga20) or that lack prion protein (knock-out) to generate mice that express varying amounts of prion protein and deposit β -amyloid. On these mouse lines, we investigated the influence of each protein on the evolution of both diseases. Our results indicated that although the presence of APP/PS1 and β -amyloid accumulation had no effect on prion infectivity, the accumulation of β -amyloid deposits was dependent on PrP^c, whereby increasing levels of prion protein were accompanied by a significant increase in β -amyloid aggregation associated with aging.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Abnormal protein processing, misfolding and aggregation are common pathological features of Alzheimer's disease (AD) and prion diseases. AD is largely characterized by the pathological misprocessing of 2 proteins: intraneuronal tau, which accumulates as paired helical filaments (PHFs), and the extracellular β -amyloid peptide (A β), which accumulates in senile plaques (Querfurth and LaFerla, 2010). The A β peptide is generated by the proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) and its accumulation in the brain of affected individuals is 1 of the hallmarks of AD (Selkoe, 2001). Several transgenic mice that develop brain deposits of human A β have been generated to study amyloidosis development, such as the mice carrying both the Swedish APP mutation and dE9 or A246E point mutations of presenilin 1 (PS1) (Feraudet et al.,

2005; Scheuner et al., 1996), widely used as an AD model (Borchelt et al., 1997; Reiserer et al., 2007).

Accumulations of prion protein are generated by the conversion of the normal cellular prion protein (PrP^c) to the infectious misfolded form (PrP^{Sc}), and they are the causative agent of prion diseases and transmissible spongiform encephalopathies (Haig and Clarke, 1971). PrP^c is a sialoglycoprotein, membrane anchor by a glycosylphosphatidylinositol (Stahl et al., 1987), and it is predominantly expressed in neural tissue (Bendheim et al., 1992; Brown et al., 2000; Pammer et al., 1998). PrP^c has been implicated in cell–cell signalling and cell adhesion during embryogenesis (Cashman et al., 1990; Dodelet and Cashman, 1998; Manson et al., 1992; Reilly, 2000), although genetic ablation of the prion protein gene (*PRNP*) in mice does not drastically compromise embryonic viability, indicating that PrP^c is dispensable during ontogeny (Bueler et al., 1992).

The relationship between AD and prion disease has already been described (Baier et al., 2008). Moreover, a recent study described the binding of A β oligomers to PrP^c and proposed that PrP^c is required for the suppression of synaptic plasticity by A β oligomers

* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM and CIBERNED, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Nicolás Cabrera 1, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 911964561; fax: +34 911964420.

E-mail address: fwandosell@cbm.uam.es (F. Wandosell).

(Lauren et al., 2009). Thus, PrP^C was proposed as a potential target to reduce Aβ deposition (Gimbel et al., 2010), although subsequent *in vivo* experiments reported Aβ-induced memory impairment in the absence of PrP^C (Balducci et al., 2010). Together with recent findings attributing some prion-like behavior to Aβ (Calella et al., 2010; Feraudet et al., 2005; Morales et al., 2011), these data suggest that these monomeric and oligomeric peptides interact *in vivo*. Based on these findings, we investigated the effect of Aβ peptide accumulation on prion infectivity and, conversely, the effect of differential *PRNP* gene dose on Aβ deposition.

To analyze the putative relationship between both proteins *in vivo*, we crossed APP/PS1 transgenic mice with mice in which PrP^C was deleted, or overexpressed, thereby generating APP/PS1 double-transgenic mice expressing 4 distinct *PRNP* gene doses. Prion infectivity was unaffected by the presence of Aβ peptide or Aβ deposits, and, as expected, only the absence of PrP^C compromised prion infectivity. By contrast, the accumulation of Aβ peptides in senile plaques in brain parenchyma was directly correlated with PrP^C expression in older animals. These findings confirm that PrP^C and APP metabolism are closely linked, and suggest that the deposition of Aβ peptide is pathologically modulated by PrP^C.

2. Method

2.1. Experimental animals

We used 3 transgenic mouse lines (Table 1) to generate the 8 genotypes analyzed: the B6.Cg-Tg (APP^{Swe}, PSEN1^{dE9}) mouse line (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME; stock no. 005864), which expresses human APP (Swedish mutation) and presenilin 1 with a deletion in exon 9 (APP/PS1); the PrP^C knockout mouse line, 129P2/OlaHsd-*Prnp*^{tm2Edin/JH} (*Prnp*^{0/0}), which has been described previously (Manson et al., 1994); and the *Prnp*^{tg20} mouse line (Institut National de la Recherche Agronomique; INRA, Tours, France), generated by introducing a PrP-encoding construct into *Prnp*^{0/0} mice (C57BL/6-129S7/Sv-Tg20) (Fischer et al., 1996). In our animal facility, hemizygous *Prnp*^{tg20} expressed 3 to 4 times more PrP^C than wild-type animals (see below).

To compare the effect of PrP^C level on Aβ accumulation, transgenic APP/PS1 mice and non-transgenic mice with the same genetic background (APP/PS1^{+/+}) were crossed with either *Prnp*^{0/0} or *Prnp*^{tg20} mice to generate mice with distinct genotypes but on the same mixed genetic background (Table 1).

Animal care and handling was performed in accordance with Spanish legislation (Spanish Royal Decree 1201/2005 BOE published October 21, 2005) and the guidelines of the European Commission for the accommodation and care of laboratory animals (revised in Appendix A of the Council of Europe Convention ETS123). The use of wild-type and transgenic animals was an absolute requirement for this project; however, experiments were designed to minimize the use of animals. All transgenic mice and non-transgenic littermates were group-housed in standard cages with fiber bedding, under a 12-hour light/12-hour dark cycle and with access to food and water *ad libitum*.

2.2. Genotyping

Genotype was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) analysis of tail biopsy samples taken from young mice.

APP/PS1 and APP/PS1^{+/+} mice were genotyped using 3 primers as described previously (Jankowsky et al., 2001): 1 antisense primer matching the sequence within PrP (5': GTGGATACCCCTCC-CCAGCCTAGACC); 1 sense primer specific for the transgene (PS1: 5': CAGGTGGTGAGCAAGATG, APP: 5': CCGAGATCTCTGAAGTG-

AAGATGGATG); and a second sense primer specific for the genomic PrP (5': CCTCTTTGTGACTATGTGGACTGATGTCGG).

Prnp^{0/0} transgenic mice were genotyped using the following primers: 5'-ATGGCGAACCTTGGCTACTGGC-3' and 5'-GATTATGGG-TACCCCTCCTGG-3' for the *PRNP* gene (Castilla et al., 2003); and 5'CGCTTGATCCGGCTACTGCC-3' and 5'-AGCTCTTCAGCAA-TATCACGGG-3' for the neo gene.

Prnp^{tg20} transgenic mice were genotyped using the primers 5'-CATCTGCTTCTAGTGATACC-3' and 5'-GCCAAGACAAGCAGGA-AGG-3'.

2.3. Prion inoculation

The prion inoculates used in this study were prepared from brain tissues as 10% (w/v) homogenates in 5% glucose. The mouse scrapies 22L inoculum was pooled from 3 brains of terminally diseased 129/Ola mice intracranially inoculated with 22L (kindly provided by Dr Olivier Milhavel, IHG, CNRS, and Montpellier, France). The murine BSE (bovine spongiform encephalopathy) inoculum was generated by 3 serial passages of bovine BSE in intracranially inoculated 129/Ola mice. The final mouse-adapted BSE was pooled from 3 brains of terminally diseased BSE-inoculated mice. Individual mice (6–8 weeks old) were anesthetized and inoculated with 20 μL of brain homogenate in the right parietal lobe using a disposable 25-gauge hypodermic needle. Mice were observed daily, and their neurological status was assessed weekly. When progression of transmissible spongiform encephalopathies was observed, the animals were sacrificed, and their brains were harvested for subsequent biochemical and histological analysis. In all cases, the survival time and attack rate were

Table 1 Generation of transgenic mice

Breeding protocol	
F0	APP-PS1 ^{+/+} X Prnp ^{0/Prnp} ⁰
F1	Prnp ^{0/+} APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{0/+} X Prnp ^{0/Prnp} ⁰
F2	Prnp ^{0/+} APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{0/+} APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{0/Prnp} ⁰
+/+; +/+ APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{0/Prnp} ⁰ Prnp ^{0/+} APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{0/+} APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{0/Prnp} ⁰	
Experimental groups of mice	
F0	APP-PS1 ^{+/+} X Prnp ^{tg20/Prnp} ^{tg20}
F1	APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{tg20/+} +/+; Prnp ^{tg20/+}
+/+; +/+ APP-PS1 ^{+/+} APP-PS1 ^{+/+} Prnp ^{tg20/+} Prnp ^{tg20/+}	
Experimental groups of mice	
Genotypes APP-PS1; Prnp/Prnp	Generated lines (Used names)
APP-PS1 ^{+/+} ; Prnp ^{0/Prnp} ⁰	APP/PS1 Prnp o/o
+/+; Prnp ^{0/Prnp} ⁰	APP/PS1 ^{+/+} Prnp ^{0/0}
APP-PS1 ^{+/+} ; Prnp ^{0/+}	APP/PS1 Prnp ^{+/0}
APP-PS1 ^{+/+} ; Prnp ^{0/+}	APP/PS1 ^{+/+} Prnp ^{+/0}
APP-PS1 ^{+/+} ; Prnp ^{+/+}	APP/PS1 Prnp ^{+/+}
+/+; +/+	APP/PS1 ^{+/+} Prnp ^{+/+}
APP-PS1 ^{+/+} ; Prnp ^{tg20/+}	APP/PS1 Prnp ^{tg20}
+/+; Prnp ^{tg20/+}	APP/PS1 ^{+/+} Prnp ^{tg20}

Schematic representation of the breeding protocol and the experimental groups used. Transgenic mouse lines were generated by crossing APP/PS1 and APP/PS1^{+/+} mice with either Prnp^{0/0}, or Prnp^{tg20} mice to generate distinct lines expressing 0 (Prnp^{0/0}), 1 (Prnp^{+/0}), 2 (Prnp^{+/+}) or multiple (Prnp^{tg20}) copies of the *Prnp* gene. Names used along experiments refer to the specific genotype.

calculated for each inoculum: survival time was expressed as the mean (\pm SEM) number of days survived post-inoculation for all mice positive for PrP^{Res} (abnormal prion protein) attack rate was calculated as the proportion of inoculated mice positive for PrP^{Res}.

2.4. Tissue sampling

Mice were sacrificed by CO₂ inhalation (uninoculated animals) or cervical dislocation (prion transmission experiments), and their brains were removed and split into 2 hemibrains. One hemibrain was snap-frozen on dry ice for subsequent homogenization, whereas the other was fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and cryoprotected in graded concentrations of sucrose (15%–30%) in PBS. The fixed tissue was then set in O.C.T. compound (Tissue-Tek, Sakura, NL) and frozen at -80°C .

2.5. Tissue processing

Brain tissue for enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) was homogenized in 8 volumes of ice-cold guanidine buffer (5 mol/L guanidine/HCl, 50 mmol/L Tris HCl, pH 8). The homogenates were mixed for 3 hours at room temperature and stored at -20°C . To analyze the brain tissue in Western blots, it was homogenized in 3 volumes of ice-cold lysis buffer (20 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L NaVO₄, 5 mmol/L EDTA, 1% Triton X100) with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic) and 1 $\mu\text{mol/L}$ okadaic acid (Calbiochem). The homogenate was then centrifuged at 4°C for 20 minutes at $16,000 \times g$ and the supernatant stored at -20°C . The protein concentration was measured using the BioRad DC Protein Assay (BioRad) following the manufacturer's protocol and before resolving the proteins, loading buffer (10% sodium dodecyl sulfate [SDS], 0.5 mmol/L dithiothreitol, 325 mmol/L Tris HCl, pH 6.8, 87% glycerol, and bromophenol blue) was added to the supernatants.

2.6. ELISA quantification of A β (1–40 and 1–42)

Brain homogenates were diluted 1:50 in PBS–Tween–bovine serum albumin (BSA) buffer (0.03% Tween-20, 5% BSA in PBS) before centrifugation ($16,000 \times g$ for 20 minutes at 4°C), and the supernatant was analyzed immediately. Brain amyloid burden was measured using the A β 40 or A β 42 Human ELISA kit (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Plate absorbance was measured at 450 nm using an Opsy MR microplate reader (Dyner Technologies).

2.7. Gel electrophoresis and Western blots

Non-infected mouse brain extracts were resolved by SDS/polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE; 20 μg protein/lane) and transferred onto nitrocellulose (Whatman) or PVDF (Millipore) membranes. The membranes were incubated in 10% solution of non-fat milk for 1 hour at room temperature and after overnight incubation at 4°C with the primary antibody; they were washed in 0.1% Tween-PBS and incubated with the secondary horseradish peroxidase–conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The antibody binding was detected with Super-signal (Pierce), using GAPDH or actin as internal controls. The intensity of each band was determined using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

To PrP^{Res} determination, frozen mouse brain samples were homogenized in 5% glucose in distilled water using grinding tubes (Bio-Rad) and adjusted to 10% (w/v) using the TeSeE Precess 48 Ribolyser COGER (Bio-Rad) according to the manufacturer's

instructions. All samples were analyzed in Western blots using the TeSeE Western Blot kit (Bio-Rad), adjusting for the different amounts of sample used as described previously (Padilla et al., 2011). Briefly, to obtain the recommended volume, 100 μL of brain homogenate was supplemented with 10% (w/v) negative sheep brain homogenate to obtain a final volume of 200 μL . Processed samples were loaded on Criterion 12% acrylamide gels (165.6001, Bio-Rad) and electrotransferred to immobilon membranes (IPVH 000 10, Millipore). For immunoblotting experiments, Sha31 mAb (Feraudet et al., 2005) was used at 1 $\mu\text{g/mL}$, and the immunocomplexes were detected as previously described.

2.8. Antibodies

Several antibodies were used for immunohistochemistry and to probe Western blots. Amyloid species were detected using 6E10 (#SIG39320, Covance) that identifies amino acid residue 1–16 of A β , and 22C11 (#MAB348, Millipore) that recognizes the N-terminal epitope of APP. PSD95 (#3450, Cell Signalling) and Synapsin-1 (D12G5) XP (#5297 Cell Signalling) were used as controls for synaptic proteins. Astrocytes were detected using anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; #556327, BD Pharmingen), β -secretase (BACE) with (D10E5; #5606, Cell Signalling), and PrP^C with anti-PrP 6H4 (#01-010, Prionics). Different tau phosphorylation sites were identified using: pTau Tyr18 (9C3), a gift from Prof. Gloria Lee (University of Iowa); pTau Thr181 (#11107, Signalway Antibody); pTau Ser199/202 (pSp5; #44-768G, Invitrogen) and pTau Ser396/404 (PHF-1), a gift from Prof. Peter Davies (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA). Total levels of tau protein were determined using monoclonal Tau5 antibody (#A8B0042, Invitrogen). Kinase levels were determined using the following antibodies, all from Cell Signalling: phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2; Thr202/Tyr204) E10 (#9106); phospho-GSK- α (Ser21/9; #9331); Akt (#9272); phospho-Akt (Ser473; D9E) XP (#4060); and phospho-Akt (Thr308; #9275). The autophagy pathway was analyzed using the following antibodies: anti-LC3B (microtubule associated protein-1 light chain 3; #L7543, Sigma); phospho-S6 ribosomal protein (Ser240/244; #2215 Cell Signalling); and p70 S6 kinase α (C-18) (#sc-230 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

GAPDH (#9484, Abcam) or anti- β -actin (#MAB1501 Millipore or #A5441 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used as internal controls.

2.9. Immunohistochemical studies

Hemibrains were fixed in 4% PFA and 30- μm -thick coronal cryostat sections (Leica) were pretreated with 70% formic acid before blocking in serum for 1 hour. The sections were then incubated for 1 hour with the 6E10 anti-A β antibody (1:1000; Covance) or anti-GFAP (1:1000 dilution; BD Pharmingen) and after washing, they were incubated with anti-rabbit or anti-mouse biotinylated secondary antibody for 30 minutes. Antibody staining was visualized with the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) using diaminobenzidine (DAB) as the chromogen (Sigma Aldrich). Finally, the slices were mounted on slides and coverslipped with with Entellan New medium (Electron Microscopy Sciences).

For immunofluorescence assays, following incubation with the primary antibody and subsequent washing, the sections were incubated with anti-rabbit Alexa 488 and anti-mouse Alexa 555 conjugated secondary antibodies (Invitrogen). After washing, DAPI (Invitrogen) was used to label the cell nuclei and the sections were mounted with Fluoromount G (Southern Biotech). Finally, sections were visualized by light and fluorescence microscopy (Axiovert200, Zeiss) and images were captured using a SPOT RT Slider camera (Diagnostic).

2.10. Image analysis and quantification of amyloid plaque load

Analyses were performed using ImageJ software, and the area occupied by amyloid plaques was represented as a percentage of the total area analyzed.

2.11. Statistical analysis

Data were analyzed using the Student t test or the rank sum test.

3. Results

3.1. Generation of transgenic mice and survival analysis

Animals of the APP/PS1 mouse line have been reported to die prematurely (Gimbel et al., 2010; Halford and Russell, 2009). Thus, to evaluate the effects of different levels of PrP expression on APP/PS1 mortality, we monitored longevity from 0 to 9 months in 950 individual mice of 8 distinct genotypes of APP/PS1 and APP/PS1^{-/-} mice expressing different levels of PrP^{Sc} relative to wild-type mice: *Prnp*^{Tga20} (4- to 6-fold increase), *Prnp*^{+/+} (equivalent), *Prnp*^{+/-} (50%) and *Prnp*^{0/0} (none) (Table 1). Although mortality in our APP/PS1 colony was not as high as that previously described (Gimbel et al., 2010), differences in longevity were not linked to PRNP gene dose; rather, they were associated with the presence of the APP/PS1 double transgene (Fig. 1). The survival rate of all APP/PS1 animals was reduced as compared with APP/PS1^{-/-} mice ($p < 0.05$), irrespective of the PrP^{Sc} burden, although near-significant differences in survival were observed between APP/PS1 *Prnp*^{0/0} and APP/PS1 *Prnp*^{Tga20} mice ($p = 0.056$).

3.2. Prion infection

To determine the influence of amyloid processing and deposition on the infective capacity of prions, we analyzed the transmission of 2 different prion inocula, mouse 22L and mouse-adapted BSE, in APP/PS1 transgenic mice as opposed to in wild-type (APP/PS1^{-/-}) mice. The survival rates of APP/PS1 transgenic mice (129 ± 2 days) and APP/PS1^{-/-} mice (139 ± 7 days) inoculated with 22L did not differ significantly. When inoculated with a mouse-BSE inoculum, the mice survived longer than the 22L-inoculated mice, although there were no significant differences between APP/PS1^{-/-} (201 ± 9.8 days) or APP/PS1 (182 ± 1 days) mice. Moreover, *Prnp*^{0/0} mice used as a negative control exhibited no symptoms after prion

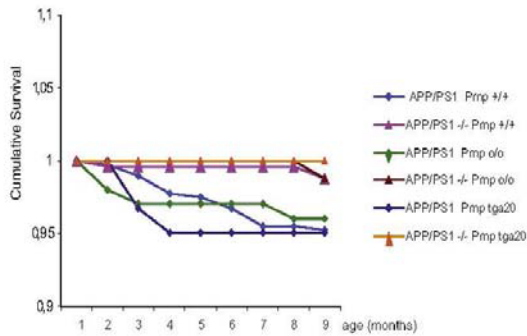


Fig. 1. Survival of the different transgenic mouse lines. Cumulative survival time of APP/PS1 and APP/PS1^{-/-} mice in which PrP^{Sc} was overexpressed (*Prnp*^{Tga20}), deleted (*Prnp*^{0/0}), or normal (wild type; *Prnp*^{+/+}) was recorded over 9 months. Survival was only reduced in colonies expressing the APP/PS1 transgene.

Table 2

Intracerebral transmission of 2 prion strains in the presence or absence of APP/PS1

Inocula	APP/PS1 gene	Attack rate	Survival time	n	p Value (t test)
22L	-/-	100	129.25 ± 8.09	4	NS
22L	+/+	100	139.75 ± 5.11	4	
Mouse adapted BSE	-/-	100	201.17 ± 9.83	6	
Mouse adapted BSE	+/+	100	182 ± 0	5	

Two prion strains (L22 and mouse-adapted BSE) were intracerebrally inoculated into the different transgenic mouse lines. Data represent the mean (±SEM) survival (in days) and attack rate (%), in the presence/absence of the APP/PS1 transgene. Key: NS, not significant.

injection (data not shown). Taken together, these findings suggest that APP/PS1 does not affect the infective capacity of prions or the progression of prionopathy in this murine model (Table 2). In Western blots there were no differences in the molecular profile of PrP^{Res} between the different mouse lines inoculated with the same inocula, indicating that the presence of APP/PS1 during prion replication does not alter the biochemical properties of PrP^{Sc} (Fig. 2). Analysis of the effect of APP/PS1 on prion infectivity revealed no differences between 22L-inoculated APP/PS1 and APP/PS1^{-/-} mice expressing different levels of PrP^{Sc}. By contrast, the infectivity of the 22L inoculum differed according to PrP^{Sc} gene dose, ranging from 215 to 243 days in *Prnp*^{+/-} mice to 79 to 82 days in *Prnp*^{Tga20} mice (Table 3). Only in the case of *Prnp*^{+/-} mice did we detect a slight difference containing APP/PS1 or not (215.75 ± 2.59 vs. 243.83 ± 7.12 , $p = 0.015$). Therefore, strongly support the hypothesis that prion infectivity is dependent on PrP^{Sc} levels but not necessarily on amyloid burden.

3.3. Amyloid peptide accumulation

We next investigated the effect of PRNP gene dose on the deposition of Aβ1-40 and Aβ1-42, and the number of amyloid-positive plaques, analyzing the evolution of Aβ deposits in the different groups of mice (Table 1) from 1 to 9 months of age, using in all cases the corresponding littermates, as indicated in the breeding protocol.

ELISA results showed that Aβ1-40 and Aβ1-42 accumulation increased with age in all genotypes expressing APP/PS1 (Fig. 3A).

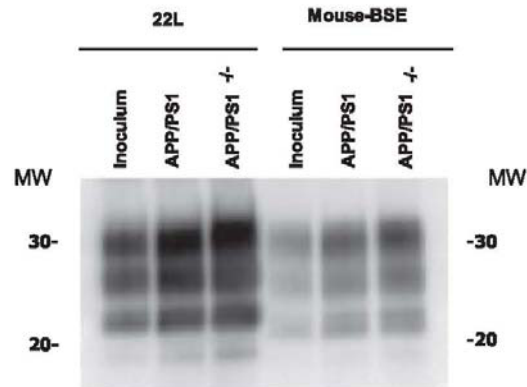


Fig. 2. Molecular profile of PrP^{Res} detected in APP/PS1 mice. Tissue samples were digested with PK (see Method section), and the protease-resistant material was analyzed in Western blots probed with the monoclonal Sha31 antibody, revealing comparable glycoproteins of brain PrP^{Res} in all mouse lines inoculated with the same inocula.

Table 3
Intracerebral transmission of the 22L prion strain in APP/PS1 and APP/PS1 ^{-/-} mice expressing different levels of PrP^C

APP/PS1 gene	Prnp gene	Attack rate	Survival time	n	p Value (t test)
-/-	tga20	100	79.67 ± 1.48	6	NS
+/+	tga20	100	82.8 ± 1.32	5	
-/-	+/+	100	129.25 ± 8.09	4	NS
+/+	+/+	100	139.75 ± 5.11	4	
-/-	+/-	100	243.83 ± 7.12	6	0.015
+/+	+/-	100	215.75 ± 2.59	4	
-/-	o/o	-	-	5	
+/+	o/o	-	-	5	

Data represent animal survival as a function of PrP^C expression. Note that prion infectivity is positively correlated (early appearance) with PrP^C but not APP/PS1 expression. Only PrP^C knockout mice (Prnp^{0/0}) displayed no symptoms at any time during the study.
Key: NS, not significant.

Amyloid burden in younger animals' brain was similar; however, 9-month-old mice showed significant differences in Aβ1-40 and Aβ1-42 depending on *PRNP* gene dose. The Aβ1-40 highest levels were detected in APP/PS1 Prnp^{tga20} mice, which differed significantly from those of Prnp^{0/0} ($p = 0.015$) and Prnp^{+/-} ($p = 0.037$) mice but not from those of Prnp^{+/+} mice (Fig. 3B). Analysis of Aβ1-42 accumulation revealed significant differences between Prnp^{tga20} and Prnp^{+/-} mice ($p = 0.034$; Fig. 3B). As expected no human Aβ was detected in the APP/PS1 ^{-/-} Prnp^{+/+} or APP/PS1 ^{-/-} Prnp^{0/0} control mice (data not shown). Surprisingly, the Aβ1-42/Aβ1-40 ratio increased in APP/PS1 Prnp^{0/0} versus APP/PS1 Prnp^{tga20} mice, suggesting an association between γ -secretase specificity and PrP^C dose.

To confirm our ELISA data and to visualize the oligomerization state of the amyloid peptides, monomeric (3–4 kDa) and oligomeric forms (12–14 kDa) of Aβ were quantified in 9-month-old mouse samples by Western blot. Increases in both the oligomeric (3-fold) and monomeric (2-fold) forms were observed in the APP/PS1 Prnp^{tga20} with respect to the APP/PS1 Prnp^{+/+} genotype (Fig. 4B), in clear correlation with the ELISA data. Comparable levels of the monomeric and oligomeric Aβ forms were observed in Prnp^{0/0} and Prnp^{+/-} mice.

These blot images confirmed the genotypes by analysis of PrP^C expression, which revealed a 3-fold increase in PrP^C in Prnp^{tga20} mice with respect to Prnp^{+/+} mice (Fig. 4A), although the presence or absence of APP/PS1 had no significant effect on PrP^C expression in brain extracts.

An analysis of the APP levels revealed similar levels of 22C11-positive sAPP in all genotypes (Fig. 4A), irrespective of PrP^C expression. Similar levels in transgenic APP were seen with 6e10 antibody that showed no signal on APP/PS1 ^{-/-} mice (Fig. 4A). To rule out the possibility that variations of Aβ peptide levels were due to an aging-associated increase in β -secretase accumulation, BACE1 levels were analyzed and were found to be comparable in all genotypes (Fig. 4A).

3.4. Amyloid plaque study

After quantifying the amyloid burden in the brains of all the transgenic lines, we used immunohistochemistry to determine whether the amount of Aβ peptides was correlated with the number of senile plaques.

When Aβ-immunoreactive plaques were visualized using the 6E10 antibody and DAB (see Method section), we observed an increase from 3 to 9 months as we have seen by ELISA, both in the cortex and hippocampus (Fig. 5I). Nine-month-old mice showed a

clear difference in plaque number and density in APP/PS1 Prnp^{tga20} versus APP/PS1 Prnp^{0/0} mice (Fig. 5A and B). If plaque density was represented as the percentage of the relative area occupied by plaques, the "amyloid deposit" area was much greater in APP/PS1 Prnp^{tga20} mice, consistent with our previous findings. Moreover, this area was significantly greater in APP/PS1 Prnp^{+/+} (5.54%) and APP/PS1 Prnp^{tga20} (6.13%) mice than in APP/PS1 Prnp^{0/0} mice (4.1%, $p = 0.015$ and $p < 0.001$ respectively; Fig. 5J).

The increases observed in Aβ burden and plaque size were accompanied by a parallel increase in the astrocytic reactivity around the amyloid plaques (Fig. 5E–H). GFAP-reactive glia were not diminished by PrP^C deletion, and they appeared to be dependent only on plaque size and complexity.

3.5. P-tau levels

A second important hallmark in many transgenic mouse models of AD is an increase in tau phosphorylation, which may correlate with the progression of amyloidosis (Feraudet et al., 2005; Kurt et al., 2003). In our transgenic mouse model, we analyzed the levels of phosphorylated tau at different times (at 3, 6, and 9 months of age) using site-specific antibodies (PHF-1, Thr181, pSpS, and 9G3) and a tau5 antibody as a control of total tau (detailed in Methods section). When all the signals were normalized to those of β -actin, significant increases in tau phosphorylation were detected at 9 months in APP/PS1 Prnp^{tga20} and APP/PS1 ^{-/-} Prnp^{tga20} mice using the 9G3 antibody only (Fig. 6A). A parallel analysis of the phosphorylation status of GSK3, Erk, and Akt kinases, which may influence tau phosphorylation, revealed no significant differences between genotypes (Fig. 6B).

3.6. Synaptic proteins

In some AD transgenic mice (e.g., APP_{SwInd} line J9 and APP_{Ind}), synaptic dysfunction has been shown to accompany the amyloid events (DeKosky and Scheff, 1990; Hsia et al., 1999) and hence, we studied the effects of overexpression or deletion of PrP^C on an APP/PS1 background on synaptic proteins (Fig. 7). Western blotting revealed some differences in PSD95 expression, which decreased by 15% in mice overexpressing or lacking PrP^C, as compared with Prnp^{+/+} mice, and it diminished by 10% in APP/PS1 ^{-/-} Prnp^{+/+} versus APP/PS1 Prnp^{+/+} mice, not statistically significant in any case. Similarly, levels of synapsin-1 were 10% lower in APP/PS1 Prnp^{0/0} than in APP/PS1 Prnp^{+/+} mice ($p = 0.08$).

3.7. Autophagy analyses

Modifications in autophagy has been described in AD patients (Cataldo et al., 1996; Nixon et al., 2005), and treatment with rapamycin, an mTORC1 inhibitor, reduces the amount of h-Aβ and amyloid plaques in some transgenic mouse models (Spilman et al., 2010). To see the influence of prion levels on the evolution of AD, we followed some autophagy markers searching any relationship between these both processes. We studied mTORC1 activity directly, by quantifying one of its immediate substrates (S6K), and indirectly by measuring levels of phosphorylated pS6. There were no statistically significant differences in S6K or pS6R (Fig. 8). The second method to estimate autophagy is to determine LC3-II level (i.e., (Tasdemir et al., 2008)). Our data showed that whereas LC3II levels were comparable in APP/PS1 Prnp^{+/+} and APP/PS1 Prnp^{0/0} mice, significant differences were observed between APP/PS1 Prnp^{tga20} and APP/PS1 Prnp^{+/+} mice ($p = 0.018$), as well as between APP/PS1 Prnp^{tga20} and APP/PS1 Prnp^{0/0} ($p = 0.029$) mice (Fig. 8).

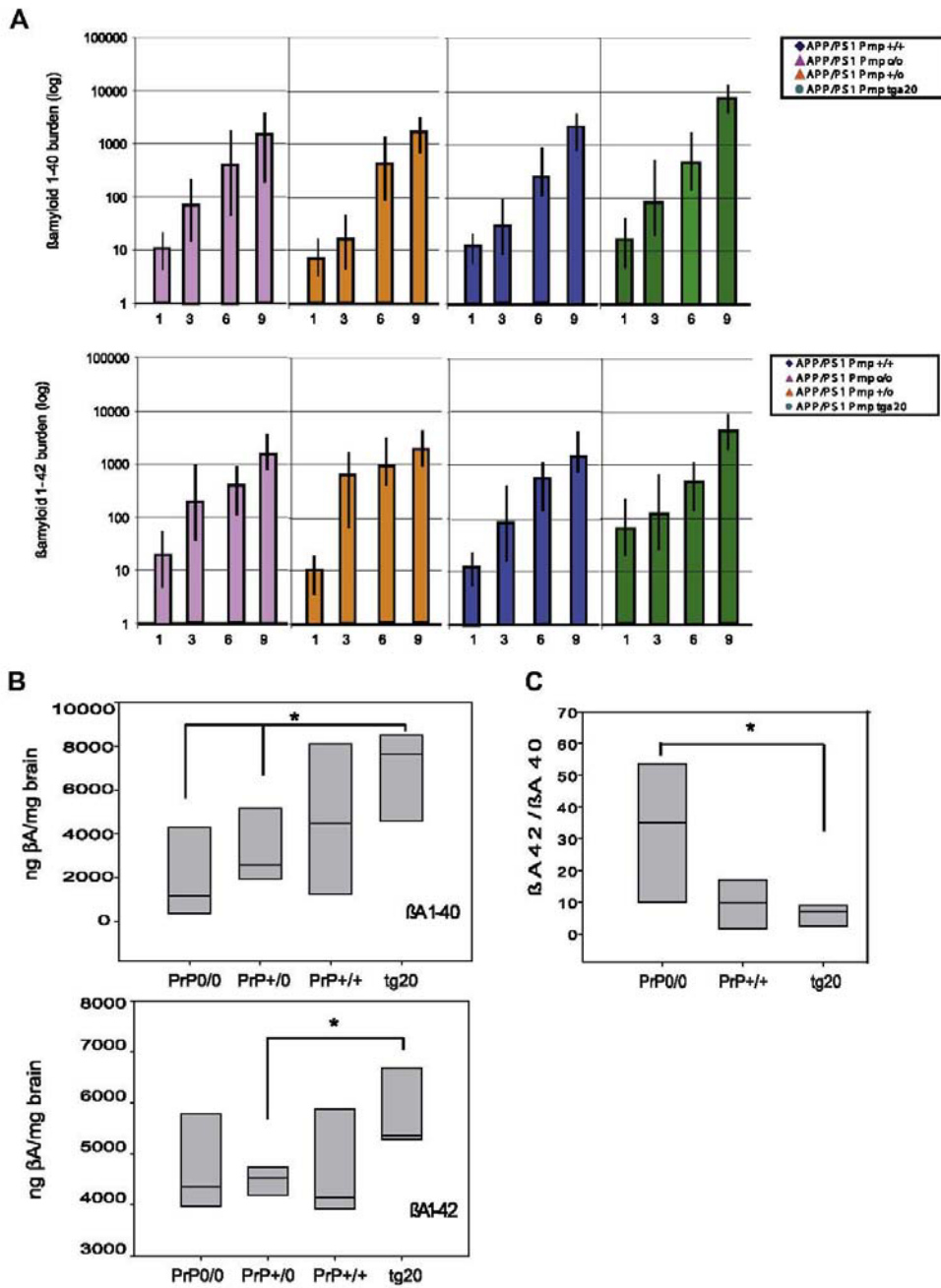


Fig. 3. β-amyloid accumulation in 9-month-old transgenic mice. (A) Time course of β-amyloid burden (1-40 and 1-42), measured by enzyme-linked immunosorbent assay from 1 to 9 months. (B) Aβ 1-40 and 1-42 in 9-month-old mice. (C) βA42/βA40 ratio in 9-month-old mice of different genotypes (* *p* < 0.05).

4. Discussion

The accumulation of Aβ1-40/42/43 in senile plaques, 1 of the pathological hallmarks of AD, increases with age in transgenic mouse models (Johnson-Wood et al., 1997; Kawarabayashi et al.,

2001). Indeed, we observed a progressive increase in amyloid burden from 1 to 9 months of age in APP/PS1 mice irrespective of the PRNP gene dose. Nevertheless, direct interactions between Aβ and PrP^C have been proposed (Balducci et al., 2010; Lauren et al., 2009), suggesting a potential relationship between AD and prion

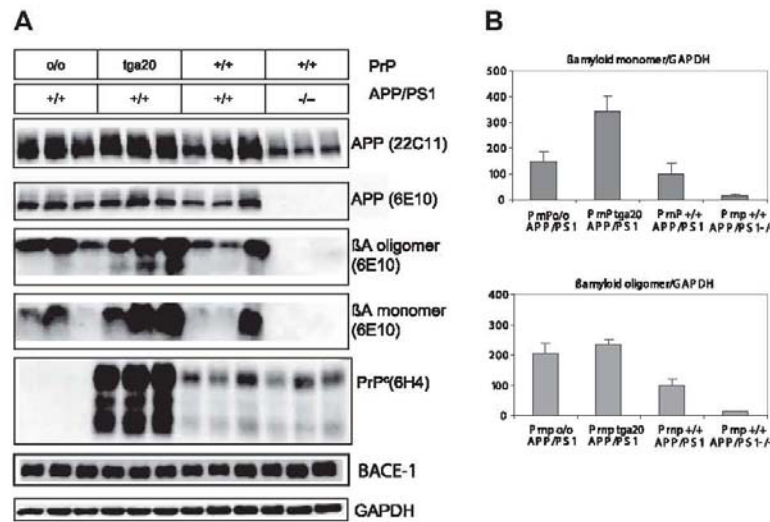


Fig. 4. Aβ oligomerization state, and APP and BACE1 levels. (A) Different species of APP and amyloid protein detected in Western blots using different monoclonal antibodies. 22C11 detected murine and human APP, whereas 6E10 detected only human APP and several aggregation states of β-amyloid. Levels of β-secretase (BACE1) and GAPDH were also determined in these samples. As an internal control, PrP^c levels were quantified using 6H4 antibody. (B) Densitometric data indicating the expression of β-amyloid monomers and oligomers. Data were normalized with respect to GAPDH and represented as relative units, with APP/PS1 Prnp^{+/+} values considered as 100 RU.

diseases. Although, using transgenic mice with amyloid deposits and different levels of PrP^c expression in the brain revealed no major effect of PrP^c dose on Aβ synaptotoxicity (Caella et al., 2010), memory (Balducci et al., 2010), or effects on Aβ (1-40/42) accumulation (Gimbel et al., 2010; Lauren et al., 2009; Schwarze-Eicker et al., 2005). We performed a complementary study to analyze the accumulation of amyloid deposits in the brain from 0 to 9 months. Moreover, we evaluated putative molecular interactions between PrP^c/PrP^{Sc} and APP/Aβ by studying the effect of differential PrP^c expression on amyloidosis, and the effect of varying amyloid levels on prion infectivity.

Following the evolution of the amyloidosis, we observed a progressive increase in amyloid burden from 1 to 9 months of age in APP/PS1 mice irrespective of the PRNP gene dose; however, 9-month-old mice showed significant differences. The lowest Aβ levels observed in our study were detected in APP/PS1 Prnp^{0/0} mice at 9 months of age, although these levels did not differ significantly from those of their APP/PS1 Prnp^{+/+} littermates. Increases in PrP^c dose in different genotypes were accompanied by parallel and significant increases in Aβ deposits, indicating a direct dose-dependent correlation. Accordingly, APP/PS1 Prnp^{tg20} mice exhibited the highest number of Aβ containing plaques and the greatest Aβ1-40 and 1-42 burden. These parameters peaked in 9-month-old mice, suggesting a time-dependent interaction between PrP^c and amyloid burden. It is possible that the seeding effect attributed to Aβ (Kane et al., 2000; Langer et al., 2011) may be enhanced by PrP^c, which colocalizes with Aβ (Kaiser et al., 2012). In fact interaction between PrP^c and Aβ42 has been reported (Lauren et al., 2009). Some data described the presence of PrP^c, accumulated in dystrophic neurites in AD (Takahashi et al., 2011). These authors suggested that PrP^c was a mediator of Aβ oligomer induced synaptic dysfunction. But maybe, PrP^c only collaborate in plaque formation and this fact increases the toxic consequences. Moreover γ-secretase could be influenced by the presence of PrP^c near APP, and Aβ 40 or 42 production could be modulated. This interaction could explain the important differences that we see in 42/40 ratio between Prnp^{0/0} and Prnp^{tg20}.

PrP^c has been proposed as a therapeutic target for AD and given its proposed aggregatory effects on Aβ, reduction of PrP^c expression may decrease plaque formation (Chung et al., 2010).

As expected, increased Aβ accumulation in plaques was correlated with the presence of reactive astroglia, in line with previous reports (Ilaria et al., 2011).

To elucidate the mechanism underlying PrP-dependent Aβ accumulation, we quantified the expression of the APP precursor protein and the levels of β-secretase. No differences in APP levels were observed at any time point in any of the genotypes. β-secretase has been implicated in amyloid production and plaque formation (Cai et al., 2011), and its activity is directly related to Aβ load (Capetillo-Zarate et al., 2012; Ho et al., 2005). Several authors have proposed that β-secretase cleavage of APP by BACE1 is inhibited by PrP^c, and that the absence of PrP^c promotes an increase in Aβ production, supporting a relationship between β-secretase and PrP^c (Kellett and Hooper, 2009; Parkin et al., 2007). However, most of these studies were performed in cell culture. We observed no variation in BACE1 expression in older animals, thereby ruling out this possibility. In fact some report indicated that the deletion of PrP^c did not affected APP or Aβ deposition in AD mouse model (Griffiths et al., 2011). Moreover, our in vivo results revealed a significant increase in Aβ deposits in older animals expressing high PrP^c levels, with no significant effect on APP or BACE1 levels. Based on these findings, it is tempting to speculate that it is not basal amyloid levels that are modified but, rather, secondary events associated with the degradation or alternative production of amyloid. In support of this view, disruption of autophagy and lysosomal proteolysis has been described recently in response to PS1 mutations (Borchelt et al., 1997). Moreover, the reduction in Aβ levels have been reported in some murine models of AD after treatment with the mTORC1 inhibitor rapamycin (Jaeger et al., 2010; Nixon et al., 2005; Spilman et al., 2010), although other studies failed to reproduce such effects (Boland et al., 2010). The level of S6K activation inferred from S6K-Thr 289, showed no significant differences between APP/PS1 Prnp^{0/0} and APP/PS1 Prnp^{tg20}. Indeed this S6K activity is not significantly different from genotypes, as reflected in

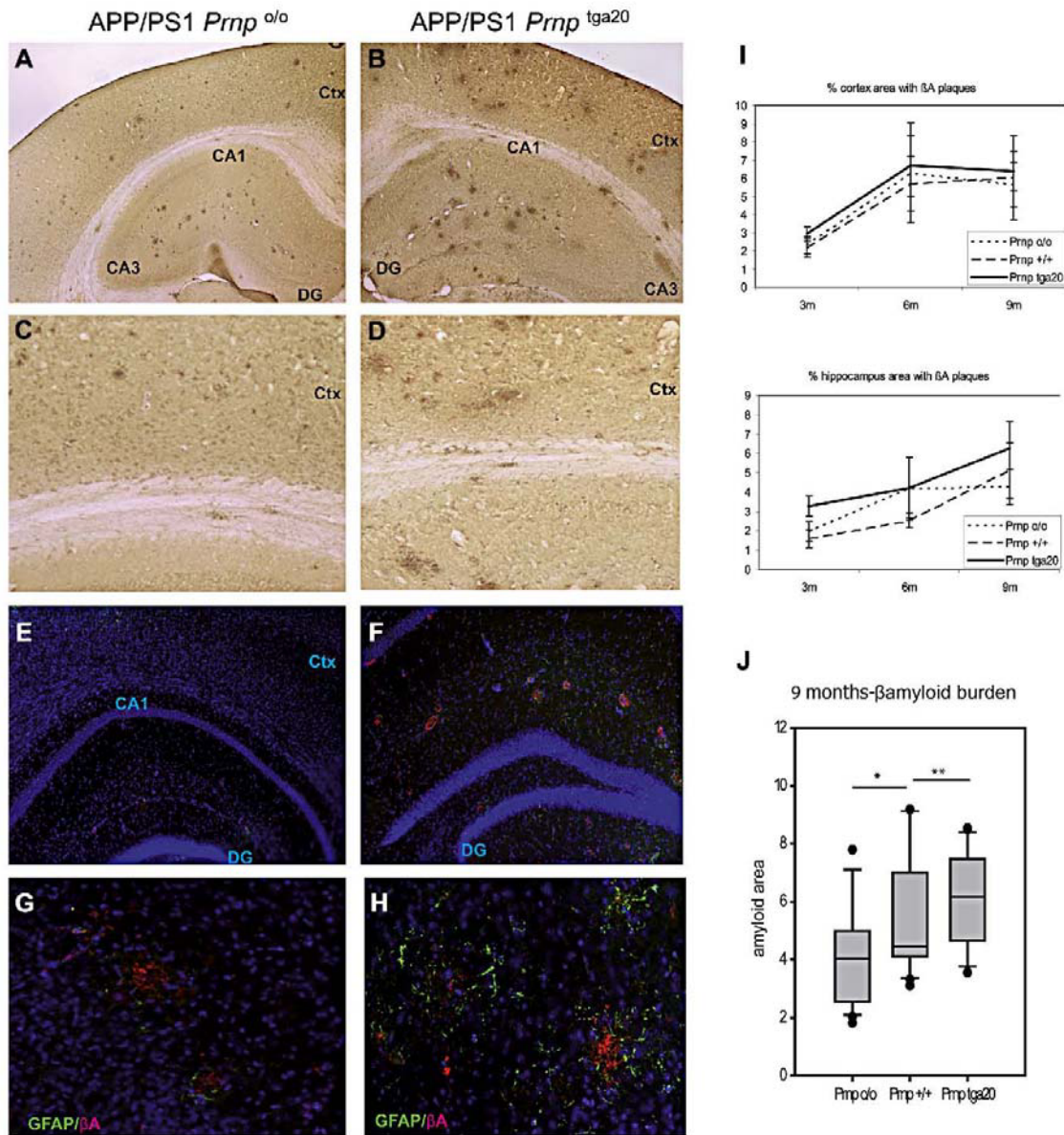


Fig. 5. Immunohistochemistry and immunofluorescence analyses. (A–D) 6E10 staining of APP/PS1 *Prnp*^{0/0} and APP/PS1 *Prnp*^{tg20} mice. (E–H) 6E10 (red), GFAP (green), and DAPI (blue) staining showing the correlation between amyloid protein and reactive glia. (I) The proportion of the cortex and hippocampus occupied by 6E10-positive amyloid plaques in 3-, 6-, and 9-month-old mice with 3 different doses of PrP^C showed an increase with the age. (J) Results obtained in the brain of 9-month-old mice. Graph represents the mean of 3 different sections from each mouse. * *p* < 0.05, ** *p* < 0.005).

its substrate S6. As a further measure of autophagy, we also determined the steady-state levels of LC3II, which was greater in APP/PS1 *Prnp*^{tg20} mice as opposed to APP/PS1 *Prnp*^{0/0} mice. It is tempting to propose that, in neurons, the level of mTORC1 activity inferred from S6K, not necessarily predict an autophagy status. It remains unclear whether dysfunctional autophagy underlies the PrP^C-dependent accumulation of Aβ, or whether this is a secondary effect reflecting the stress generated by increased amyloid burden.

Further studies will be necessary to determine whether autophagy is dysregulated by an “undefined aging-dependent effect,” resulting in increased generation of amyloid peptide.

Given the putative molecular interaction between APP and PrP^C, and the recent reports attributing some prion-like behavior to amyloid protein (Calella et al., 2010; Feraudet et al., 2005; Morales et al., 2011), we investigated the effect of amyloid accumulation on prion infectivity. Although previous studies described

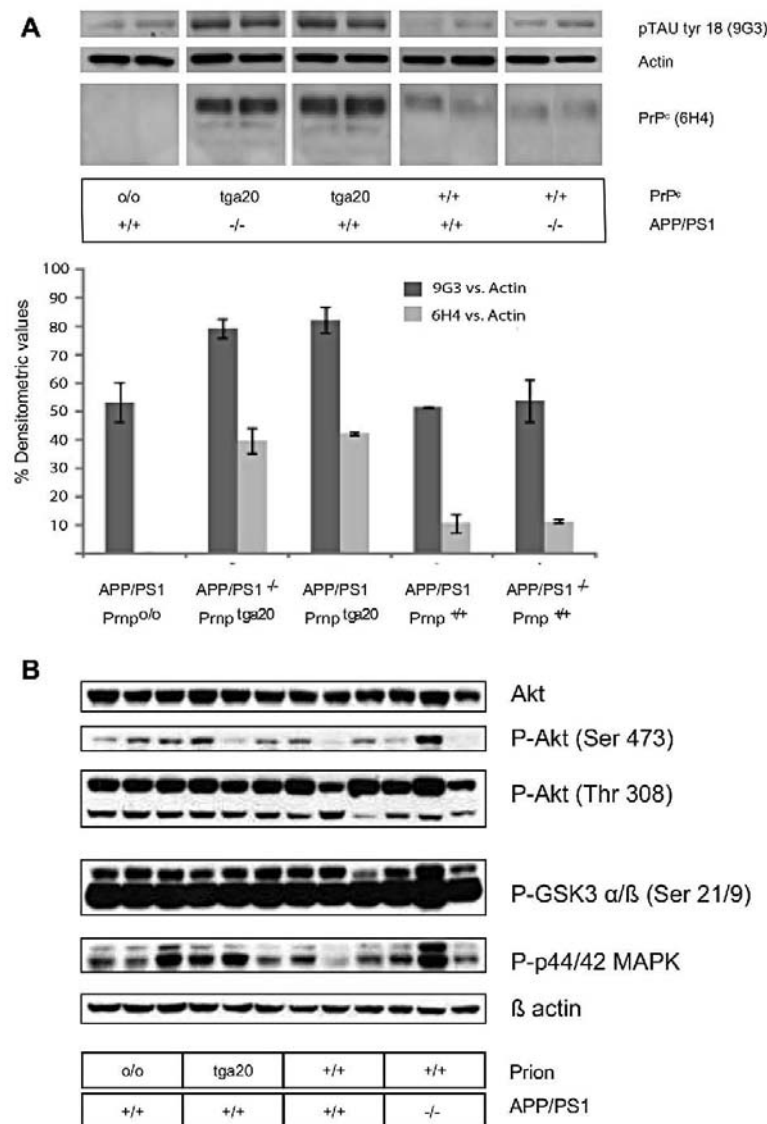


Fig. 6. Western blot analysis of p-tau and kinase levels. (A) Tyr 18 phospho-tau (9G3) and PrP^c expression for each genotypic group are expressed as relative densitometric units with respect to β-actin. Note the significant increase in 9G3 signal in 9-month-old APP/PS1 Prnp^{tga20} and APP/PS1^{-/-} Prnp^{tga20} mice, which correlates with PrP^c overexpression. (B) MAPK, Akt, and GSK3 expression in 9-month-old mice of each genotype.

some differences in the rate of survival after prion infection in the presence/absence of APP (Baier et al., 2008), we observed no such differences when mouse have 2 or more copies of *Prnp*. In those cases, prion infectivity was correlated only with the presence or absence of PrP^c. In contrast, it has been reported that in Tg2576 mouse model, prion infection is different from wild-type littermates (Morales et al., 2010). In our APP/PS1 model, we could not detect such differences even using 2 different prion mouse-adapted strains. Only in the presence of 1 copy of *Prnp* gene mouse expressing APP/PS1 appears have a shorter survival rate, which was statistically significant. In addition, we have to

remember that, in our case, the inoculation method and the amount of prion injected per mouse is different from these reported for Tg2576 mouse-prion infected (Morales et al., 2010). Thus, we cannot discard the possibility that an undefined element may enhance the infectivity capacity of prion, not directly APP or Aβ mediated.

Depending on the transgenic lines analysed, Aβ accumulation may correlate with a wide range of neurotoxic and synaptotoxic markers (Capetillo-Zarate et al., 2012; Freir et al., 2011; Mucke, 2009). However, studies investigating the effects of PrP^c on synaptic transmission have yielded controversial data (Balducci et al.,

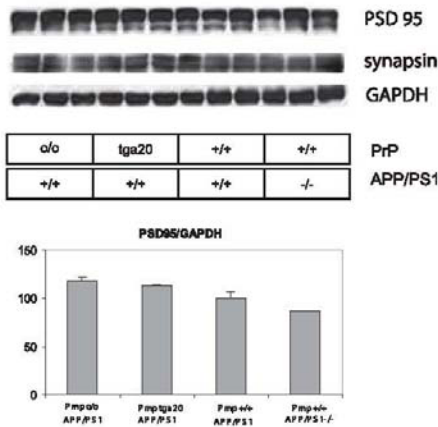


Fig. 7. Synaptic protein expression. Synaptic proteins, PSD95, and synapsin, in each genotype represented normalized to GAPDH expression levels showed no significant differences between the groups.

2010; Calella et al., 2010; Curtis et al., 2003; Rangel et al., 2009). Similarly, analyses of the influence of PrP^C on Aβ oligomer-mediated synaptic toxicity have produced conflicting results (Balducci et al., 2010; Calella et al., 2010; Gimbel et al., 2010; Kessels et al., 2010; Lauren et al., 2009). In our experimental conditions, we observed a non-significant effect on the expression of synaptic proteins analyzed.

Increased tau protein level is a further important hallmark of AD. A detailed analysis of tau phosphorylation revealed increased expression of the phosphorylated Tyr-18 epitope in APP/PS1 PrP^{tg20} and APP/PS1 / PrP^{tg20} mice. However, no changes in other tau phospho-epitopes were detected at any time point in any of the genotypes analyzed. Tyr-18 phosphorylation is associated with Src kinases, particularly Fyn activity, and it is detected in

neurons and the parenchyma of AD patients (Lee et al., 2004), as well as in murine models of tauopathies and AD (Bhaskar et al., 2010). Altered Fyn activity has been demonstrated in AD patients (Ho et al., 2005) and it mediates the synaptic and cognitive impairments observed in some AD mouse models (Chin et al., 2005). A recent study on the 3xTg mouse model of AD (Bhaskar et al., 2010) reported that AT8 phosphorylation occurs earlier than that of Tyr-18 (Bhaskar et al., 2010). In our study, higher Tyr-18 levels were only correlated with increased Aβ burden and the appearance of plaques in APP/PS1 PrP^{tg20} mice, whereas no such associations were observed for other tau epitopes. It should be noted that the evolution of tau epitope expression in AD mouse models remains a subject of debate, as the expression of AT8-positive residues has only been described after 1 year of life (McKee et al., 2008; Oddo et al., 2003). Thus, we cannot rule out the possibility that other phospho-tau epitopes are expressed at later stages in this model. Our data strongly suggest that the appearance of Tyr-18 is correlated with PrP^C burden. PrP^C is present in lipid rafts and triggers Fyn activation when activated (Mouillet-Richard et al., 2007). Increased PrP^C expression may correlate with further PrP^C-caveolin binding at the lipid raft, thus triggering Fyn activation and Tyr-18 tau phosphorylation. This hypothesis is supported by the specific activation of Fyn seen in the APP/PS1 mouse model. In addition, recent data have indicated that the binding of oligomeric Aβ to PrP^C generated Fyn activation (Abramowski et al., 2012). Our data indicated that this activation is increased by extra copies of PrP^C and that this effect is age dependent.

In summary, the present findings demonstrate that the presence of APP/PS1 does not necessarily affect prion disease infectivity. By contrast, the formation of Aβ deposits is dependent on PrP^C dose. These findings suggest the existence of a molecular pathway that mediates APP/PrP^C interaction, which may modulate the final proteolytic processing of APP, perhaps via autophagy. Finally, Tyr-18 tau phosphorylation correlated with the increasing amyloid deposition age-dependent on APP/PS1/tg20 mice. This permits us to propose a secondary effect on AD models, which is a Fyn kinase age-dependent activation.

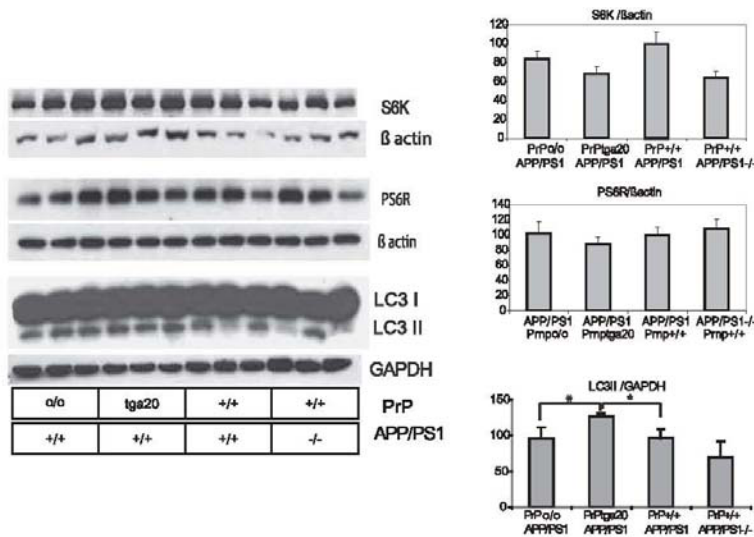


Fig. 8. Quantification of S6K-P, P-S6, and LC3-II protein. Levels of phosphorylated S6 and S6K showed no significant differences between APP/PS1 PrP^{0/0} and APP/PS1 PrP^{tg20}. However LC3-II expression, as a measure of autophagosome initiation, differed significantly between APP/PS1 PrP^{0/0} and APP/PS1 PrP^{tg20} mice. Graphs represent the mean expression from 3 different mice in different Western blots (* p < 0.05).

Disclosure statement

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED; an initiative of the ISCIII) to the laboratories of FW and JdR. In addition, work in the laboratory of F.W. was supported by grants from EU-FP7-2009-CT222887 and in part by the "Plan Nacional," "Dirección General de Ciencia y Tecnología-DGICYT" [SAF2012-39148-C03-01]; CAM S2010/BMD-231-(2010-14); and by an Institutional grant from the "Fundación Areces". J.A.D.R. was supported by MINECO, FP7-PRIORITY, Generalitat of Catalunya (SGR2009-366), DEMTEST (Joint Programming of Neurodegenerative diseases-EU), and R.G. by the Fondo de Investigación Sanitaria (PI11-00075). Work at the laboratory of J.M.T. was supported by grants from the European Union (EU-FP7-2009-CT222887) and the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2009-11553-C02-02). The funders of this study had no role in the study design, data collection and analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

References

- Abramowski, D., Rabe, S., Upadhyaya, A.R., Reichwald, J., Danner, S., Staab, D., Capetillo-Zarate, E., Yamaguchi, H., Saido, T.C., Wiederhold, K.H., Thal, D.R., Staufenbiel, M., 2012. Transgenic expression of intraneuronal Abeta42 but not Abeta40 leads to cellular Abeta lesions, degeneration, and functional impairment without typical Alzheimer's disease pathology. *J Neurosci* 32, 1273–1283.
- Baier, M., Apelt, J., Riemer, C., Gultner, S., Schwarz, A., Bamme, T., Burwinkel, M., Schliebs, R., 2008. Prion infection of mice transgenic for human APPSwe: increased accumulation of cortical formic acid extractable Abeta(1-42) and rapid scrapie disease development. *Int J Dev Neurosci* 26, 821–824.
- Baldacci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Sclip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., Chiesa, R., Gobbi, M., Salmona, M., Forloni, G., 2010. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2295–2300.
- Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kascak, R.J., Cashman, N.R., Bolton, D.C., 1992. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42, 149–156.
- Bhaskar, K., Hobbs, G.A., Yen, S.H., Lee, G., 2010. Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36, 462–477.
- Boland, B., Smith, D.A., Mooney, D., Jung, S.S., Walsh, D.M., Platt, E.M., 2010. Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 285, 37415–37426.
- Borchelt, D.R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M.K., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L., Sisodia, S.S., 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19, 939–945.
- Brown, D.R., Hafiz, F., Glasssmith, L.L., Wong, B.S., Jones, I.M., Clive, C., Haswell, S.J., 2000. Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *Embo J* 19, 1180–1186.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C., 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577–582.
- Cai, Y., Zhang, X.M., Macklin, L.N., Cai, H., Luo, X.G., Oddo, S., Laferla, F.M., Struble, R.G., Rose, G.M., Patrylo, P.R., Yan, X.X., 2011. BACE1 Elevation is Involved in Amyloid Plaque Development in the Triple Transgenic Model of Alzheimer's Disease: Differential Abeta Antibody Labeling of Early-Onset Axon Terminal Pathology. *Neurotox Res* 21, 160–174.
- Calella, A.M., Farinelli, M., Nuvolone, M., Mirante, O., Moos, R., Falsig, J., Mansuy, I.M., Aguzzi, A., 2010. Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* 2, 306–314.
- Capetillo-Zarate, E., Gracia, L., Tampellini, D., Gouras, G.K., 2012. Intraneuronal Abeta accumulation, amyloid plaques, and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 10, 56–59.
- Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascak, R.J., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., 1990. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61, 185–192.
- Castilla, J., Gutierrez Adan, A., Brun, A., Pintado, B., Ramirez, M.A., Parra, B., Doyle, D., Rogers, M., Salguero, F.J., Sanchez, C., Sanchez-Vizcaino, J.M., Torres, J.M., 2003. Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol* 148, 677–691.
- Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Mann, D.M., Nixon, R.A., 1996. Colocalization of lysosomal hydrolase and beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum and striatum in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 704–715.
- Chin, J., Palop, J.J., Puolivali, J., Massaro, C., Bien-Ly, N., Gerstein, H., Scearce-Lavie, K., Masliah, E., Mucke, L., 2005. Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25, 9694–9703.
- Chung, E., Ji, Y., Sun, Y., Kascak, R.J., Kascak, R.B., Mehta, P.D., Strittmatter, S.M., Wisniewski, T., 2010. Anti-PrP monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. *BMC Neurosci* 11, 130–140.
- Curtis, J., Errington, M., Bliss, T., Voss, K., MacLeod, N., 2003. Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. *Neurobiol Dis* 13, 55–62.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27, 457–464.
- Dodelet, V.C., Cashman, N.R., 1998. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 91, 1556–1561.
- Feraudet, C., Morel, N., Simon, S., Volland, H., Frobert, Y., Creminon, C., Vilette, D., Lehmann, S., Grassi, J., 2005. Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrPSc replication in infected cells. *J Biol Chem* 280, 11247–11258.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., Weissmann, C., 1996. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *Embo J* 15, 1255–1264.
- Freir, D.B., Fedriani, R., Scully, D., Smith, I.M., Selkoe, D.J., Walsh, D.M., Regan, C.M., 2011. Abeta oligomers inhibit synapse remodeling necessary for memory consolidation. *Neurobiol Aging* 32, 2211–2218.
- Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Coffey, E.E., Gunther, E.C., Lauren, J., Gimbel, Z.A., Strittmatter, S.M., 2010. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30, 6367–6374.
- Griffiths, H.H., Whitehouse, I.J., Baybutt, H., Brown, D., Kellett, K.A., Jackson, C.D., Turner, A.J., Piccardo, P., Manson, J.C., Hooper, N.M., 2011. Prion protein interacts with BACE1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and Swedish mutant amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 286, 33489–33500.
- Haig, D.A., Clarke, M.C., 1971. Multiplication of the scrapie agent. *Nature* 234, 106–107.
- Halford, R., Russell, D., 2009. Reduction of cholesterol synthesis in the mouse brain does not affect amyloid formation in Alzheimer's disease, but does extend lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3502–3506.
- Ho, G.J., Hashimoto, M., Adame, A., Izu, M., Alford, M.F., Thal, L.J., Hansen, L.A., Masliah, E., 2005. Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role. *Neurobiol Aging* 26, 625–635.
- Hsia, A.Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., Mucke, L., 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3228–3233.
- Ilaria, L., Cristina, G., Chiara, T., Anna, F., Teresa, E.D., Fiorella, C., 2011. "Abeta plaque-associated glial reaction as a determinant of apoptotic neuronal death and cortical gliogenesis: A study in APP mutant mice." *Neurosci Lett* 506, 94–99.
- Jaeger, P.A., Pickford, F., Sun, C.H., Lucin, K.M., Masliah, E., Wyss-Coray, T., 2010. Regulation of amyloid precursor protein processing by the Bcl-1 complex. *PLoS One* 5, e11102.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Borchelt, D.R., 2001. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17, 157–165.
- Johnson-Wood, K., Lee, M., Motter, R., Hu, K., Gordon, G., Barbour, R., Khan, K., Gordon, M., Tan, H., Games, D., Lieberburg, I., Schenk, D., Seubert, P., McConlogue, L., 1997. Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1550–1555.
- Kaiser, D.M., Acharya, M., Leighton, P.L., Wang, H., Daude, N., Wohlgemuth, S., Shi, B., Allison, W.T., 2012. Amyloid beta precursor protein and prion protein have a conserved interaction affecting cell adhesion and CNS development. *PLoS One* 7, e51305.
- Kane, M.D., Lipinski, W.J., Callahan, M.J., Bian, F., Durham, R.A., Schwarz, R.D., Rother, A.E., Walker, L.C., 2000. Evidence for seeding of beta-amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci* 20, 3606–3611.
- Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Saido, T.C., Shoji, M., Ashe, K.H., Younkin, S.G., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 372–381.
- Kellett, K.A., Hooper, N.M., 2009. Prion protein and Alzheimer disease. *Prion* 3, 190–194.
- Kessels, H.W., Nguyen, L.N., Nabavi, S., Malinow, R., 2010. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* 466, E3–E4, discussion E4–5.
- Kurt, M.A., Davies, D.C., Kidd, M., Duff, K., Howlett, D.R., 2003. Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiol Dis* 14, 89–97.
- Langer, F., Eisele, Y.S., Fritsch, S.K., Staufenbiel, M., Walker, L.C., Jucker, M., 2011. Soluble Abeta seeds are potent inducers of cerebral beta-amyloid deposition. *J Neurosci* 31, 14488–14495.

- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., Strittmatter, S.M., 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128–1132.
- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V.M., Litersky, J.M., Bhaskar, K., Fang, S.M., Do, L.H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., Ksiezak-Reding, H., 2004. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 2304–2312.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, L., Hope, J., 1994. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8, 121–127.
- McKee, A.C., Carreras, L., Hossain, L., Ryu, H., Klein, W.L., Oddo, S., LaFerla, F.M., Jenkins, B.G., Kowall, N.W., Dedeoglu, A., 2008. Ibuprofen reduces Abeta, hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Res* 1207, 225–236.
- Morales, R., Duran-Aniotz, C., Castilla, J., Estrada, L.D., Soto, C., 2011. De novo induction of amyloid-beta deposition in vivo. *Mol Psychiatry* 17, 1347–1353.
- Morales, R., Estrada, L.D., Diaz-Espinoza, R., Morales-Scheihing, D., Jara, M.C., Castilla, J., Soto, C., 2010. Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases. *J Neurosci* 30, 4528–4535.
- Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Pradines, E., Pietri, M., Ermonval, M., Grassi, J., Richards, J.G., Mutel, V., Launay, J.M., Kellermann, O., 2007. Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1096, 106–119.
- Mucke, L., 2009. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature* 461, 895–897.
- Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., Cuervo, A.M., 2005. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 113–122.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., LaFerla, F.M., 2003. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 1063–1070.
- Padilla, D., Beringue, V., Espinosa, J.C., Andreoletti, O., Jaumain, E., Reine, F., Herzog, L., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Laude, H., Torres, J.M., 2011. Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog* 7, e1001319.
- Pammer, J., Weninger, W., Tschachler, E., 1998. Human keratinocytes express cellular prion-related protein in vitro and during inflammatory skin diseases. *Am J Pathol* 153, 1353–1358.
- Parkin, E.T., Watt, N.T., Hussain, I., Eckman, E.A., Eckman, C.B., Manson, J.C., Baybutt, H.N., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2007. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11062–11067.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362, 329–344.
- Rangel, A., Madronal, N., Gruart, A., Gavin, R., Llorens, F., Sumoy, L., Torres, J.M., Delgado-García, J.M., Del Rio, J.A., 2009. Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS One* 4, e7592.
- Reilly, C.E., 2000. Nonpathogenic prion protein (PrPc) acts as a cell-surface signal transducer. *J Neurol* 247, 819–820.
- Reiserer, R.S., Harrison, F.E., Syverud, D.C., McDonald, M.P., 2007. Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 6, 54–65.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 864–870.
- Schwarze-Eicker, K., Keyvani, K., Gortz, N., Westaway, D., Sachser, N., Paulus, W., 2005. Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiol Aging* 26, 1177–1182.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* 3, 75–80.
- Spilman, P., Podlutska, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., Galvan, V., 2010. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, e9979.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., Prusiner, S.B., 1987. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229–240.
- Takahashi, R.H., Tobiume, M., Sato, Y., Sata, T., Gouras, G.K., Takahashi, H., 2011. Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology* 31, 208–214.
- Tasdemir, E., Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Criollo, A., Vitale, I., Hangen, E., Modjtahedi, N., Kroemer, G., 2008. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol* 445, 29–76.

Capítulo 2:

Role of PrP^C Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution

Vergara C, Ordóñez-Gutiérrez L, Wandosell F, Ferrer I, Del Río JA, Gavín R

Resumen:

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una acumulación de péptidos A β en forma de placas y de la proteína tau hiperfosforilada en forma de ovillos neurofibrilares. Recientemente se ha sugerido que son los oligómeros de A β y no las placas, los responsables de los efectos patológicos en la enfermedad causados por este péptido, y que PrP^C podría actuar de mediador por su interacción de alta afinidad con el péptido A β . La teoría más aceptada postula que A β es el principal efector de la toxicidad presente en la enfermedad, pero también se considera que tau es decisiva para la progresión de la neurodegeneración. De hecho, se han publicado estudios en los que se ve una regulación de la expresión de PrP^C durante el desarrollo de la enfermedad, pero el papel de tau y de su interacción con PrP^C no se ha estudiado en detalle.

En este trabajo se puede ver como cultivos primarios neuronales que no expresan la proteína PrP^C, obtenidos de animales KO para la proteína, exhiben una mayor susceptibilidad a oligómeros de A β así como una mayor expresión de la proteína tau. Este aumento en la proteína tau era específico de los oligómeros y no de las fibras. Estos resultados fueron corroborados mediante cultivos de animales *wild type*, en los que se silenció la expresión de PrP^C con lentivirus.

También se ha realizado un estudio temporal desde los 3 meses de edad hasta los 18 meses, viéndose un incremento de la expresión del péptido A β_{42} con la edad. A nivel de PrP^C y tau, los resultados muestran un incremento de ambas al inicio de la enfermedad tanto en un modelo de ratón como en pacientes. PrP^C aumentaría para regular los niveles de tau al inicio, aunque como ya se ha visto en otros estudios, los niveles de la proteína caen en estadios avanzados de la enfermedad y se perdería esta capacidad de regulación, que no se produce a nivel del promotor de tau.

Por último, estos resultados se corroboraron también en ratones APP/PS1/Prnp^{0/0} triples transgénicos en los que se vio un incremento de los niveles de tau, en comparación con animales Prnp^{0/0}, debido a la presencia de A β .

Role of PrP^C Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution

C. Vergara · L. Ordóñez-Gutiérrez · F. Wandosell · I. Ferrer · J. A. del Río · R. Gavín

Received: 17 April 2014 / Accepted: 15 June 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of amyloid plaques mainly consisting of hydrophobic β -amyloid peptide (A β) aggregates and neurofibrillary tangles (NFTs) composed principally of hyperphosphorylated tau. A β oligomers have been described as the earliest effectors to negatively affect synaptic structure and plasticity in the affected brains, and cellular prion protein (PrP^C) has been proposed as receptor for these oligomers. The most widely accepted theory holds that the toxic effects of A β are upstream of change in tau, a neuronal microtubule-associated protein that promotes the polymerization and stabilization of microtubules. However, tau is considered decisive for the progression of neurodegeneration, and, indeed, tau pathology

correlates well with clinical symptoms such as dementia. Different pathways can lead to abnormal phosphorylation, and, as a consequence, tau aggregates into paired helical filaments (PHF) and later on into NFTs. Reported data suggest a regulatory tendency of PrP^C expression in the development of AD, and a putative relationship between PrP^C and tau processing is emerging. However, the role of tau/PrP^C interaction in AD is poorly understood. In this study, we show increased susceptibility to A β -derived diffusible ligands (ADDLs) in neuronal primary cultures from PrP^C knockout mice, compared to wild-type, which correlates with increased tau expression. Moreover, we found increased PrP^C expression that paralleled with tau at early ages in an AD murine model and in early Braak stages of AD in affected individuals. Taken together, these results suggest a protective role for PrP^C in AD by downregulating tau expression, and they point to this protein as being crucial in the molecular events that lead to neurodegeneration in AD.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-014-8793-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Vergara · J. A. del Río · R. Gavín (✉)
Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute for Bioengineering of Catalonia, Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain
e-mail: rgavin@ub.edu

C. Vergara · L. Ordóñez-Gutiérrez · F. Wandosell · I. Ferrer · J. A. del Río · R. Gavín
Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

J. A. del Río · R. Gavín
Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

L. Ordóñez-Gutiérrez · F. Wandosell
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Cabrera 1, CBM-UAM, Madrid, Spain

I. Ferrer
Institute of Neuropathology, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospital de Llobregat, Spain

Keywords Alzheimer's disease · Microtubule-associated protein tau · Cellular prion protein · A β oligomers

Introduction

The cellular prion protein (PrP^C) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell surface protein highly expressed by neurons and glial cells in the adult central nervous system (CNS) [1–3]. Its physiological functions are poorly understood but a relation between the protein and neuroprotection has been reported [4]. The abnormal processing of PrP^C gives rise to a proteinase-k-resistant misfolded isoform termed PrP^{Sc}, which is the etiologic agent of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) [5]. These encephalopathies are characterized by profound histological changes, including extensive neuronal death, reactive

gliosis, and neuroinflammation, together with the extracellular accumulation of aggregated PrP^{Sc} in affected brains [6, 7].

As with prionopathies, the most prevalent neurodegenerative dementia, Alzheimer's disease (AD), presents extracellular deposition of an abnormally processed protein, the amyloid precursor protein (APP). Individuals suffering AD are characterized by a progressive cognitive decline and behavioral changes, and the main neuropathological hallmarks include the presence of senile plaques, enriched in β -amyloid (A β) peptide, and intracellular hyperphosphorylated tau protein which aggregates in neurofibrillary tangles (NFTs) (e.g., [8, 9]). Tau is a neuronal microtubule-associated protein that promotes the polymerization and stabilization of microtubules [10] under the regulatory control of several kinases and phosphatases. In this sense, glycogen synthase kinase 3 (GSK3 β) and the cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) are the main kinases implicated in the phosphorylation of some tau epitopes observed in AD [11–14]. When hyperphosphorylated, tau detaches from microtubules, leading to increased instability, impaired axonal transport, and profound deficits in synaptic function. In fact, today, it is recognized that some of the kinases misregulated in AD (e.g., GSK3 β) affect both A β production [15] and tau hyperphosphorylation [16].

Several TSEs show an abnormal processing of tau protein, in parallel to the presence of PrP^{Sc}. In fact, increased levels of tau protein have been detected in the cerebrospinal fluid (CSF) and serum of Creutzfeldt-Jakob's disease (CJD) patients [17, 18]. In parallel, Wang and coworkers have described several changes in expression and phosphorylation levels of tau in infected hamsters. This occurs in parallel with the alteration of Cdk5 and GSK3 transcription levels [19]. In addition, other studies have associated GSK3 β and Cdk5 activity with neurotoxic processes induced by the PrP_(106–126) peptide, a synthetic peptide widely used as a model of neurotoxicity in prion research (e.g., [20, 21]). In parallel, PrP^C may bind with several intracellular proteins including tubulin [22, 23]. And, more relevantly, Wang et al. described physical interaction between tau and PrP^C hypothesizing that the presence of phosphorylated tau in some TSEs is the result of a differential affinity between tau and the N-terminal octarepeat (OR) domain of PrP^C [24]. Moreover, the PrP^C mutation associated with Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS), *P102L*, resulting in an increased number of ORs, shows greater tau interaction [25]. Taken together, these observations suggest a role for PrP^C in tau changes related to TSEs.

The widely accepted amyloid cascade hypothesis posits that the deposition of A β in the brain parenchyma triggers a sequence of events leading to tau dysfunction [26, 27]. In this sense, Lambert and coworkers attributed higher toxic potential to A β -derived diffusible ligands (ADDLs) than to insoluble forms of A β [28]. ADDL treatment is proapoptotic, inducing

synaptic alterations and interfering with long-term potentiation [29, 30]. Lauren and coworkers point to PrP^C as being responsible for this phenomenon [31]. In this sense, transgenic AD mouse models require endogenous PrP^C to induce several deficits in learning and memory [32]. The effect of deleting PrP^C on mouse transgene phenotypes is similar to that of deleting tau expression, with a lessening of A β neuronal dysfunction in both cases [33]. At nanomolar concentrations, neurotoxicity of ADDLs depends on membrane receptors and in turn on the kinase Fyn, which induces the recruitment of oligomers in "lipid rafts" of plasma membrane [34]. Both PrP^C and tau are localized in these membrane microdomains [35]. In parallel, antibody-mediated aggregation of PrP^C on the cellular surface activates Fyn and other kinases in vitro initiating a signaling transduction cascade that induces tau phosphorylation in tyr¹⁸, an epitope implicated in AD [36–38]. In this scenario, several studies have suggested that oligomeric A β cytotoxicity in AD depends on the level of tau [39] and is mediated by PrP^C, which in turn promotes the activation of Fyn and the consequent hyperphosphorylated tau [40–42].

Additionally, several studies have reported changes in PrP^C expression in aging and in the development of AD. Higher PrP^C levels have been described in old healthy mice compared with younger animals [43]. Moreover, decreased expression of PrP^C in AD cases [43] with increased levels at the start of the disease and in other neurodegenerative disorders [44, 45] has been also reported. A recent study has shown regulation of A β production by the prion protein [46]. Taken together, these observations suggest a protective role for PrP^C in AD reinforcing the hypothesis regarding a neuroprotective function of the protein [4]. Taking into account the physical interaction between PrP^C and both ADDL and tau, we investigated the role of the tau/PrP^C relationship in the pathogenic cascade of AD, and our results indicate that PrP^C plays an important role in the molecular events that lead to neurodegeneration in AD, by regulating total tau levels.

Material and Methods

Mouse Strains and Genotyping

We used four transgenic mouse lines at different ages. In addition, embryos from pregnant females of the different genotypes were also used. Mating day was considered to be embryonic day 0 (E0) and the offspring was genotyped according to the genotype of the crossed progenitor.

Prnp^{0/0} mice bred from a C57BL6J/129, Ola/Sv background [47] were purchased from EMMA (Monterotondo, Italy). We backcrossed to C57BL/6 J for at least 15 generations to obtain *Prnp*^{0/0} and control littermates *Prnp*^{+/+}. Nine adult mice and 17 pregnant females were used in this study.

Specific primers to *Pmp* genotyping were designed in our laboratory based on the original P3 and P10 primers as described [47]: neo: 5'-gcctctatcgctcttgac-3'; 3'NCnew: 5'-gctacaggtggataaccctc-3' and P10new: 5'-cataatcagtggaacaagccc-3'. The 40 cycling conditions were 95 °C for 45 s, 62 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 5 min.

Pmp-overexpressing mice (Tg20) were purchased from EMMA. They were generated from *Pmp*^{0/0} mice as described by Fischer et al. [48]. Eleven pregnant females were used in this study. For Tg20 mice, the transgene was detected by using primers specific to the Tg20 alleles 5'-caaccgacgtgaagcattctgcta-3' and 5'-cctggactcctctgtaccgggtgacgc-3' as indicated [49].

APP/PS1 transgenic mouse line expresses human APP Swedish, and presenilin 1 deleted in exon 9 mutations, and is named B6.Cg-Tg (APPSwe, PSEN1dE9). These mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). We used 13 transgenic mice and non-transgenic littermates as controls for each age. Also, 14 pregnant females were used in this study. Mice were genotyped as by Jankowsky [50] using three primers; one antisense primer matching sequence within PrP^C (5'-gtggataccccctccccagcctagacc-3'), one sense primer specific to the transgene (PS1: 5'-caggtggaggagcaagatg-3' or APP: 5'-ccgagatctgaagtgaaagatggatg-3'), and a third sense primer specific to the genomic PrP^C (5'-cctctgtgactatgtggactgatgctgg-3').

TgTP6.3 mouse line is a transgenic mouse carrying a tau-tagged green fluorescence protein (GFP) transgene generated by Pratt et al. [51]. Mice carrying the tau-GFP transgene were identified by fluorescence microscopy of tail tissue. Three adult mice were used in this study.

All experiments were performed under the guidelines and protocols of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA) at the University of Barcelona, and the protocol for the use of animals in this study was reviewed and approved by the CEEA at the University of Barcelona (CEEA approval# 115/11).

Human Cases

Human cases comprise 6 non-AD and 31 AD postmortem brains from the Institute of Neuropathology and University of Barcelona/Hospital Clinic Brain Banks. All brains were obtained following the Code of Ethics of the World Medical Association and the protocols of the local Ethical Committee. Basic patient data are shown in Table 1. Cases with and without clinical neurological disease were processed in the same way following the same sampling and staining protocols. At autopsy, half of each brain was fixed in 10 % buffered formalin, while the other half was cut in coronal sections 1 cm thick, frozen on dry ice, and stored at -80 °C until use. In addition, 2-mm-thick samples of the cerebral

isocortex, cingulum, hippocampus and entorhinal cortex, and brainstem were fixed with phosphate-buffered 4 % paraformaldehyde for 24 h, cryoprotected with 30 % sucrose, frozen on dry ice, and stored at -80 °C until use.

Following neuropathological examination, AD cases were categorized as stages I to VI of Braak and Braak [52, 8]. Healthy cases (non-AD) did not show neurological or metabolic disease, and the neuropathological examination, carried out in similar regions and with the same methods as in AD cases, did not show lesions. In particular, no amyloid or tau deposits were seen in the regions examined. The group is represented by middle-aged adults because most individuals over 65 years old might have preclinical signs of AD [53].

Table 1 Control and AD patients, categorized as stages I to VI of Braak and Braak, used in this study

Case number	Braak and Braak stage	Gender	Age	Age (mean±s.d.m)	Postmortem delay
C1	–	M	39	46.5±5.3	9 h 15 min
C2	–	F	46		14 h 15 min
C3	–	M	53		7 h 25 min
C4	–	M	46		15 h
C5	–	M	43		4 h 35 min
C6	–	M	52		3 h
AD1	I	M	61	67.3±7.7	3 h 40 min
AD2	I	M	53		6 h 15 min
AD3	I	M	74		4 h
AD4	I	M	71		11 h 30 min
AD5	I	M	64		2 h 15 min
AD6	I	F	79		3 h 35 min
AD7	I	M	65		5 h 15 min
AD8	I	F	75		4 h 55 min
AD9	I	M	63		6 h
AD10	I	M	68		10 h 55 min
AD11	II	F	77	69.6±6.7	11 h
AD12	II	M	65		5 h
AD13	II	M	66		4 h 55 min
AD14	II	M	72		8 h 45 min
AD15	II	M	71		5 h 15 min
AD16	II	M	66		5 h
AD17	II	F	60		9 h 40 min
AD18	II	F	80		3 h 30 min
AD19	III	F	81	76.3±5.0	1 h 30 min
AD20	III	M	71		7 h 15 min
AD21	III	F	77		11 h 30 min
AD22	IV	F	80	81±2.1	2 h 45 min
AD23	IV	F	81		12 h
AD24	IV	M	84		12 h 45 min
AD25	IV	M	79		50 min
AD26	V	M	87	80.3±5.4	7 h 5 min
AD27	V	M	75		11 h 30 min
AD28	V	M	82		3 h 45 min
AD29	V	M	77		16 h
AD30	VI	M	86	76.5±13.4	20 h 35 min
AD31	VI	M	67		8 h

F female, M male

Primary Embryonic Neuronal Cultures

E15–16 mouse embryo brains were dissected and washed in ice-cold 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 6.5 mg/ml glucose. The meninges were removed and the cortical lobes isolated. Tissue pieces were trypsinized for 15 min at 37 °C. After addition of horse serum and then centrifugation, cells were dissociated by trituration in 0.1 M PBS containing 0.025 % DNase with a polished pipette (all from Sigma, MO, USA). Dissociated cells were plated at ~3,000 cells/mm² on plates (Nunc, Denmark) coated with poly-D-lysine (Sigma). The culture medium was Neurobasal supplemented with 2 mM glutamine, 6.5 mg/ml glucose, antibiotics (Pen./Strept.), 5 % horse serum, and B27 (Invitrogen-Life Technologies, Belgium). After 72 h, AraC 5 μM (cytosine β-D-arabino-furanoside hydrochloride (Sigma)) was added for 48 h to inhibit the growth of dividing non-neuronal cells. Cultures were used after 7 days in vitro.

Treatment of Cortical Cultures with Aβ Peptides

Aβ_{1–42} peptide was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Different aliquots of Aβ_{1–42} were prepared as described previously [54, 55] and stored desiccated at –80 °C. To obtain soluble oligomers (ADDLs), a working solution of 100 μM was prepared in culture medium and incubated at 4 °C for 24 h to treat the cultures with a final concentration of 10 μM. For the fibril-forming conditions, we chose the acidic pH method using 10 mM HCl with 24-h incubation at 37 °C, and cultures were treated with a final concentration of 10 μM.

Peptide-treated cells were scraped in homogenization buffer containing 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 % glycerol, 1 % Triton X-100, and 1× protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Switzerland) and 1 μM okadaic acid (Merck Millipore, MA, USA), 0.1 M sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, and 1 mM sodium orthovanadate (Sigma) as phosphatase inhibitors.

Transmission Electron Microscopy Procedures

For transmission electron microscopy (TEM), peptide solutions incubated for 24 h for each condition, both in culture medium at 4 °C and in 10 mM HCl at 37 °C, were fixed to carbon-forward-coated copper supports. Negative staining was performed using a 2 % uranyl acetate stain (pH 7.4) (Sigma), after which samples were placed in silica-based desiccant for a minimum of 2 h. Finally, we proceeded to TEM observation using a Leica microscope (Wetzlar, Germany) at the Electron Microscopy Service, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Lentiviral Vector Production

Lentiviral particles were produced by transient transfection of 293FT cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen-Life Technologies) using Mission shRNA prion protein NM_011170 (Sigma), the second-generation packaging construct psPAX2 (Tronolab, Switzerland), and the envelope plasmid pMD2G (Tronolab). 293FT cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen-Life Technologies) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) (Invitrogen-Life Technologies) and without antibiotics before transfection. Medium was changed and supplemented with antibiotics after 6 h. Vector supernatants containing viral particles were harvested approximately 48 and 72 h later and concentrated by ultracentrifugation (2 h at 26,000 rpm at 4 °C, in an Optima LK98, SW-28 rotor).

Western Blotting Techniques

Soluble extract from human hippocampal samples, mouse cortex brains, and cultured cells were processed for western blot. The collected samples were homogenized in lysis buffer: 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 % glycerol, 1 % Triton X-100 or 100 mM Tris pH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 % NP-40, and 0.5 % sodium deoxycolate, and in both cases with supplemental 1× protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitors as indicated above. After this, samples were centrifuged at 13,000×g for 20 min at 4 °C. The resulting supernatant was normalized for protein content using BCA kit (Pierce Biotechnology, USA). Cell extracts were boiled in Laemmli sample buffer [56] at 96 °C for 5 min, followed by 10 % SDS-PAGE electrophoresis, and they were then electrotransferred to nitrocellulose membranes for 1 h at 4 °C. Membranes were blocked with 5 % non-fat milk in 0.1 M Tris-buffered saline (pH 7.4) for 2 h and incubated overnight in 0.5 % blocking solution containing primary antibodies. After incubation with peroxidase-tagged secondary antibodies (1:2,000 diluted), membranes were revealed with the ECL-plus chemiluminescence western blot kit (Amersham-GE Healthcare, UK).

In our experiments, each nitrocellulose membrane was used to detect consecutive antigens. To perform this sequential incubation, membranes were incubated in 25 ml of stripping solution (2 % SDS, 62.5 mM Tris pH 6.8, and 100 mM 2-mercaptoethanol) for 30 min at 65 °C and then extensively washed before reincubation with blocking buffer and antibodies for re-blotting. Some samples were dephosphorylated using γ-phosphatase (New England Biolabs, MA, USA) as described [57].

Primary Antibodies

Several antibodies were used for immunohistochemistry and western blot. To detect amyloid species, we used 6E10 (Covance, NJ, USA), which specifically recognizes the first 16 amino acids of the A β peptide. Monoclonal anti-PrP 6H4 (Prionics, Zurich, Switzerland) was used to determine PrP^C levels. Different phosphorylation sites of tau were checked with anti-ptau thr¹⁸¹ (Signalway Antibody, MA, USA), anti-ptau ser^{199/202} (pSpS) (Invitrogen-Life Technologies), anti-ptau ser²⁰² (AT8) (Thermo Scientific, MA, USA), and anti-ptau ser^{396/404} (PHF-1), a gift from Peter Davies (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, USA). Total levels of the tau protein were checked with monoclonal tau 5 antibody (Invitrogen-Life Technologies). The monoclonal anti- β -actin antibody (Merck Millipore) was used as internal control in western blots.

A β (1-42) Quantification by ELISA

The brain homogenates obtained as described above were diluted 1:50 in albumin-PBS-Tween buffer (5 % bovine serum albumin, 0.03 % Tween 20 in PBS) before centrifugation (16,000 \times g for 20 min at 4 °C), and the supernatant was used shortly after preparation. Brain amyloid burden was measured using the A β 42 Human ELISA kit (Invitrogen-Life Technologies) following the manufacturer's protocol. Microwell plate absorbance at 450 nm was read with Ophys MR microplate reader (Dy nex Technologies, VA, USA).

RT-qPCR

Quantitative real-time PCR was performed on total RNA extracted with mirVana's isolation kit (Ambion, TX, USA) from the cortex of analyzed mice or from cultured cells. Purified RNAs were used to generate the corresponding cDNAs, which served as PCR templates for messenger RNA (mRNA) quantification. The primers used in this study for RT-qPCR validation were 5'-cccctaagtcaccatcagctagt-3' and 5'-cactttgctcaggtccaccggc-3' for mouse tau [58], and 5'-agtcgtgccaatgatca-3' and 5'-aaaaccaacctcaagcatgtgg-3' for mouse PrP^C [59].

PCR amplification and detection were performed with the ROCHE LightCycler 480 detector, using 2 \times SYBR GREEN Master Mix (Roche) as reagent, following the manufacturer's instructions. The reaction profile was denaturation-activation cycle (95 °C for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation-annealing-extension (95 °C for 10 s, 55 °C for 15 s, and 72 °C for 20 s). mRNA levels were calculated using the LightCycler 480 software. Data were analyzed with SDS 1.9.1 Software (Applied Biosystems, USA) following the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method

of Applied Biosystems [60]. The results were normalized by the expression levels of the housekeeping gene, *gapdh* (5'-aggtcgggtgtgaacggatttg-3' and 5'-ttagaccatgtagttgaggtca-3'), which were quantified simultaneously with the target gene [61].

Immunohistochemical Procedures

For immunohistochemistry, postnatal mice were anesthetized and perfused with 4 % paraformaldehyde (PFA) in PBS pH 7.4. After perfusion, the brains were removed and postfixed in the same solution for 12 h, cryoprotected in 30 % sucrose in PBS, and sectioned (30 μ m) on a freezing microtome (Leica). They were then processed for the immunohistochemical detection of A β , tau, and PrP^C, respectively, following an immunoperoxidase protocol. Briefly, free-floating sections from different developmental stages were processed in parallel. Sections were rinsed in 0.1 M PBS, and endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3 % hydrogen peroxide (H₂O₂) and 10 % methanol dissolved in 0.1 M PBS. For amyloid plaque detection, tissue was incubated in 70 % formic acid for 30 min. After extensive rinsing, sections were incubated in 0.1 M PBS containing 0.2 % gelatin, 10 % normal goat serum, 0.2 % glycine, and 0.2 % Triton X-100, for 1 h at room temperature. Afterward, sections were incubated for 36 h at 4 °C with primary antibodies. After that, sections were incubated with the appropriate secondary biotinylated antibodies (2 h, 1:200 diluted) and streptavidin-horseradish peroxidase complex (2 h, 1:400 diluted). Peroxidase activity was revealed with 0.025 % diaminobenzidine (DAB) and 0.003 % H₂O₂. After rinsing, sections were mounted onto slides and dehydrated, and coverslipped with EukittTM (Merck). Immunohistochemical controls, including omission of the primary antibody or its replacement by normal serum, were devoid of staining. Images were obtained using an Olympus BX61 microscope equipped with cooled DP72L digital camera.

Densitometry and Statistical Processing

For the quantification of western blots, developed films were scanned at 2,400 \times 2,400 dpi (i800 MICROTEK high-quality film scanner, Hsinchu, Taiwan), and the densitometric analysis was performed using Quantity One Image Software Analysis (Biorad, Barcelona, Spain). Statistical analysis of the resulting data was performed using STATGRAPHICS Plus 5.1 and Origin 8TM programs using ANOVA test. Asterisks in the histograms indicate the following *p* values of significance: (*) *p*<0.05; (**) *p*<0.01.

Results

Increased Susceptibility of Tau Phosphorylation to ADDLs in Cortical Cultures Lacking PrP^C

In vitro ADDL treatment led to hyperphosphorylated tau in several residues as also occurs in the brain parenchyma of AD patients [11, 62]. Indeed, although there were some contradictory results (i.e., ser⁴⁰⁴ residue), these tau phospho-epitopes have been largely reported [63, 64].

Initially we aimed to determine whether acute changes of *Prnp* expression might affect cellular tau levels before analyzing levels of phosphorylated tau (ptau). Thus, primary cultures from *Prnp*^{+/+}, *Prnp*^{0/0}, and Tg20 embryos were prepared. In parallel, primary cultures from *Prnp*^{+/+} embryos were treated with siRNA-PrP^C. Western blot analysis indicated that tau levels remained constant in all three genotypes and under silencing PrP^C expression (data not shown). In addition, further *MAPT* analysis of previously obtained microarray results using neuroblastoma N2a cells [65] reinforced these results showing constant tau levels in this cell line independently of PrP^C expression [65].

Next, to investigate whether PrP^C expression modulates the phosphorylation of tau induced by ADDL treatment, primary cortical neurons from *Prnp*^{0/0}, *Prnp*^{+/+}, and Tg20 embryos were incubated with 10 μM ADDLs or vehicle alone for 3, 6, and 24 h after 7 DIV (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1d). In all experiments, peptide aggregation prior to treatment was corroborated both by western blot (Supplementary Fig. S1a) and by transmission electron microscopy (TEM) observation (Supplementary Fig. S1b) (see also “Material and Methods” section for details). Densitometric analysis of revealed films demonstrated that *Prnp*^{0/0} cortical neurons incubated with ADDLs showed an increase in tau phosphorylation (phospho-tau/total tau ratio) in all residues studied (ser^{396/404}, ser²⁰²/thr²⁰⁵, and thr¹⁸¹) (Fig. 1a, c) at 3 and especially at 6 h. In contrast, no significant changes in tau phosphorylation were found in cultured *Prnp*^{+/+} cells treated with ADDLs for 3 and 6 h (Fig. 1a, c). In addition, in cultured neurons from Tg20 mice incubated with ADDLs, there was no significant increase in phosphorylation of the tau epitopes (ser^{396/404}, ser²⁰²/thr²⁰⁵, and thr¹⁸¹) when compared with *Prnp*^{+/+} cultures (Fig. 1b, c).

Synergistic Effect of Absence of PrP^C and ADDL Treatment in Tau Protein Levels in Cultured Neurons

Next, we aimed to determine whether there is an increase in tau protein levels after ADDL treatment and its putative relationship with the presence or absence of PrP^C. Results showed that after incubation of ADDLs, levels of tau (total tau/actin ratio) increased by ~12 % at 3 h and ~23 % at 6 h from treatment in *Prnp*^{0/0} cortical cultures (Fig. 1a, d). Moreover, an increase, although smaller, was observed in Tg20-

derived cortical cultures after ADDL treatment (~8 % at 3 h and ~11 % at 6 h) (Fig. 1b, d). In parallel, PrP^C levels showed an increase at 3 and 6 h after ADDL treatment only when a total tau increase was detected in Tg20 cultures (~15 % increase at 3 h and ~24 % increase at 6 h, respectively) (Fig. 1b). More relevantly, both ptau and total tau levels were unchanged after 24 h of ADDL treatment in these phenotypes (Supplementary Fig. S1d). These data correlate with the observations that Aβ aggregated for 24 h was unable to induce changes in tau levels (Supplementary Fig. S2) and that after 24 h in culture conditions (37 °C) ADDLs can form fibrils (Supplementary Fig. S1c). Taking this into account, further experiments were performed at 6 hours from ADDL treatment.

Given that the tau 5 antibody recognizes both native and phosphorylated forms of tau, some samples were dephosphorylated after 6 h following ADDL treatment using γ-phosphatase (see “Material and Methods” section for details) and then analyzed with western blotting. Our results showed an increase in total tau level independently of phosphorylation, suggesting that ADDLs cause an increase in tau expression (Fig. 1c), probably prior to hyperphosphorylation. Moreover, increased levels of tau in *Prnp*^{0/0} cultures treated with ADDLs were also corroborated with RT-qPCR at 6 h (Fig. 1f).

To discriminate between putative differences in genetic background of *Prnp*^{0/0} versus Tg20 [66] or differences due to intrinsic levels of PrP^C, we performed similar experiments in *Prnp*^{+/+} treated with lentiviral vector neurons carrying a small interfering RNA (siRNA) for *Prnp* (see “Material and Methods” section for details). Cells infected with these lentivirus showed a 15–30 % decrease in PrP^C expression according to different experiments and compared with control cultures infected with enhanced green fluorescent protein (GFP)-encoding lentiviral particles. After exposure to ADDLs for 6 h, treated cultures showed a statistically significant ~14 % increase in tau expression only when PrP^C expression was decreased (Fig. 1g). This finding suggests that a small decreased expression of PrP^C is enough to compromise the increased tau expression in the presence of ADDLs. Lastly, we also stimulated cultured *Prnp*^{0/0} cells with both ADDLs and/or Aβ fibers for 6 h to determine whether the increased tau was associated exclusively with ADDLs. Indeed, our results showed a significant increase in total tau levels with western blot only in cortical *Prnp*^{0/0} cells treated with ADDLs for 6 h (Supplementary Fig. S2). In conclusion, PrP^C seems to be a relevant factor in controlling tau levels after ADDL treatment.

Parallel Progression of PrP^C and Tau Expression in APP/PS1 Mice

Several studies have reported progressive development of AD-like pathology in an APP/PS1 mouse model including

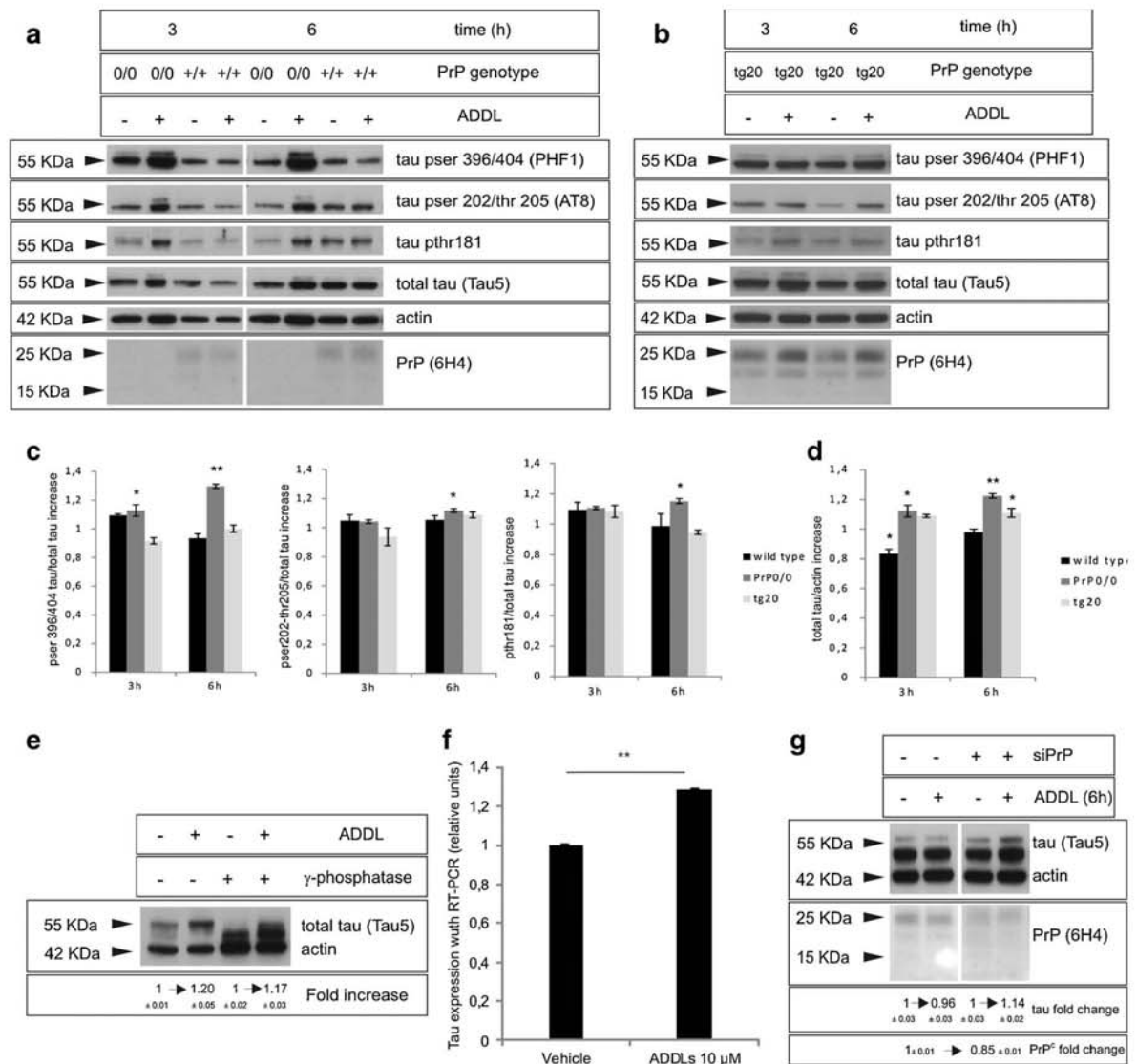


Fig. 1 Analysis of effect of ADDLs on tau. **a, b** Cortical cultures from *Prnp*^{0/0} or *Prnp*^{+/+} mice (**a**) and Tg20 mice (**b**) were treated with either ADDL (10 μM) (*n*=6 *Prnp*^{0/0}, *n*=6 *Prnp*^{+/+}, and *n*=6 Tg20) or vehicle alone for 3 and 6 h (*n*=6 *Prnp*^{0/0}, *n*=6 *Prnp*^{+/+}, and *n*=6 Tg20; each case). Samples were analyzed with western blot using different anti-phospho-tau or total tau antibodies in parallel with anti-PrP^C antibody to reveal PrP^C expression in each sample. Membranes were retested with an antibody against actin for normalization. **c** Densitometric analysis showing the increase in phosphorylated tau levels (epitopes ser^{396/404}, ser²⁰²/thr²⁰⁵, and thr¹⁸¹, respectively) only in *Prnp*^{0/0} mouse samples after 3 or 6 h of ADDL treatment when compared to the vehicle control. **d** Densitometric analysis showing the increase in total tau levels only in *Prnp*^{0/0} mouse samples at 3 and 6 h posttreatment and the slight increase in total tau levels in Tg20 mice at the same time of stimuli. Data on tau-phosphorylated and total tau protein levels in control samples (vehicle

alone) were considered as the unit at each experimental time, and the rest of the data were corrected as an increase of this initial value. **e, f** Analysis of tau expression in protein extracts of cortical *Prnp*^{0/0} cultures treated with ADDLs for 6 h after treatment with λ-phosphatase with western blot (**e**) (*n*=4) or analyzed by RT-qPCR (*n*=3) (**f**). Densitometric values in **e** are standardized with vehicle treatment, and quantification was represented as fold increase ± SEM. **g** Neuronal primary cultures from wild-type mice were also stimulated in the same conditions after silencing PrP^C expression with a lentivirus. The western blot analysis showed an increase in tau expression only in the silenced ones compared with the wild-type ones. Densitometric values in **c, d**, and **f** are standardized with vehicle treatment, and quantification was represented as fold change ± SEM. Bars represent the mean of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01 (ANOVA test)

both Aβ deposition at 4 months and the presence of hyperphosphorylated tau in affected neurons at 6 months of

age (e.g., [67, 68]). First, we analyzed the presence of amyloid plaques in the APP/PS1 model and amyloid burden in our

mouse colony (Supplementary Fig. S3). Increased levels of A β could be detected in our APP/PS1 Tg mice at 3 months of age, and increasing numbers of plaques were observed in the cerebral cortex from 4 to 9 months (Supplementary Fig. S3). Next, we aimed to analyze the correlation among tau phosphorylation, total tau levels, and PrP^C expression in the cerebral cortex of APP/PS1 Tg mice at different postnatal ages (3, 6, and 9 months) using immunohistochemistry and western blot (Fig. 2). The immunohistochemical results showed an increase in total tau immunoreactivity (Fig. 2b) in correlation with higher PrP^C expression (Fig. 2d) in 3-month-old transgenic mice when compared with wild-type (Fig. 2a, c, respectively). This correlates with western blot results (Fig. 2e). Densitometric analysis of developed films showed a ~13 % increase in total tau levels of 3-month-old Tg APP/PS1 with respect to non-transgenic mice (Fig. 2e, f) and a correlated ~16 % increase in PrP^C levels in the same animals (Fig. 2e, g). This increase of tau and PrP^C was not observed at 6 and 9 months of age. Then, analysis of phosphorylation for several tau epitopes (ser^{396/404}, ser²⁰²/thr²⁰⁵, and thr¹⁸¹) was performed in the same animals by western blot. Our results showed non-significant increase in phospho-tau/total tau ratio for any residue studied (Fig. 2e). Data from protein levels were corroborated by RT-qPCR demonstrating the peak of both mRNAs at 3 months and their decline in the cerebral cortex of APP/PS1 mice at 6 and 9 months (Fig. 2h, i).

Next, we aimed to determine whether the absence of *Prnp* modified tau expression in APP/PS1 mice. Triple APP/PS1/*Prnp*^{0/0} Tg mice [69] showed a ~22 % increased expression of tau at 9 months of age compared with non-Tg APP/PS1/*Prnp*^{0/0} mice (Fig. 3a, b), in contrast to APP/PS1 expressing normal levels of PrP^C with the same tau levels (data not shown). Lastly, we performed a reduction of *Prnp* by lentiviral vectors in APP/PS1-derived cultures (Fig. 3c). Data revealed that decreased PrP^C increased levels of endogenous tau, similar to what happens with ADDL treatment of *Prnp*^{0/0} neurons (see Fig. 3c, d). This reinforces the notion that PrP^C participates in the control of tau expression in AD.

Next, we aimed to determine whether the induced tau synthesis was regulated through the tau promoter. To this end, we generate a triple transgenic mouse resulting from crossing TgTP6.3 mouse, which overexpresses tau-GFP under the β -actin promoter, with APP/PS1. Primary neuronal cultures from embryos of these mice were treated with siRNA-PrP^C. In these cultured cells analyzed with western blot, a band corresponding to endogenous tau and the fusion protein tau-GFP could be detected at 55 and 95 kDa, respectively (Fig. 4). Revealed blots demonstrated an increase of both proteins (tau and tau-GFP) after ADDL treatment, indicating that PrP^C modulation of tau expression in ADDL-treated neurons is not specific to the tau promoter.

Correlative Progression of PrP^C and Tau Expression in Human AD Samples

Several studies have shown a decrease in PrP^C levels in different areas of AD-affected brains when compared with controls [70, 71]. However these studies were focused on advanced AD stages (from III to VI). In contrast, McNeill and coworkers demonstrated increased levels of the PrP^C in a short duration case of AD [44]. Taking into account the relation between levels of PrP^C and tau protein reported in APP/PS1 mice and in vitro models, we analyzed levels of both proteins at different stages. Developed films showed a mean of ~46 % increase in total tau levels in AD (stage I) cases with respect to healthy middle-aged individuals (Fig. 5a) and a progressive decline in protein levels in accordance with the increased PrP^C expression (from 12 to 27 % between AD stages I and III) (Fig. 5b, c).

Discussion

In this study, our experiments using *Prnp*^{0/0}, Tg20, and siRNA-lentivirus treatment support the notion that *Prnp* dosage does not influence total tau protein levels in cultured cortical neurons. This reinforces previously reported microarray data in N2a cells [65] and PrP^C mutant mice at younger stages compared with adults (2–3 months) [72–74]. However, these observations are partially in contrast with some recently published results, using human neuroblastoma [75] and HEK293 cells [74]. In these studies, forced PrP^C expression in transfected cells with low expression levels of endogenous PrP^C decreased total tau protein levels [75].

It is relevant to note that increased expression of PrP^C increased its association with lipid rafts which may in turn trigger increased intracellular oxidative stress [76, 22], thereby affecting tau expression and phosphorylation [74, 77]. In contrast to the expected result, decreased PrP^C expression in our experiments correlated with increased tau phosphorylation (ptau/total tau as well as ptau/actin ratios) after in vitro treatment with ADDLs. Thus, levels of tau, determined by tau 5 antibody, with or without γ -phosphatase treatment (to avoid simultaneous detection of some ptau epitopes with tau 5 antibody), demonstrated that ADDL treatment is able to induce a relevant increase in tau in the absence of PrP^C as well as in overexpressing cultures. In this sense, it is important to note that both a lack of PrP^C expression and overexpression of the protein may impair PrP^C function [73].

In addition, this is exclusively associated with ADDL treatment since aggregated A β is unable to induce these effects in treated neurons. In fact, aggregated peptides in fibrillar forms failed to activate tau phosphorylation (e.g., tyr¹⁸ residue) in contrast to the antibody-mediated PrP^C aggregation in the membrane [37]. Thus, PrP^C reduces the

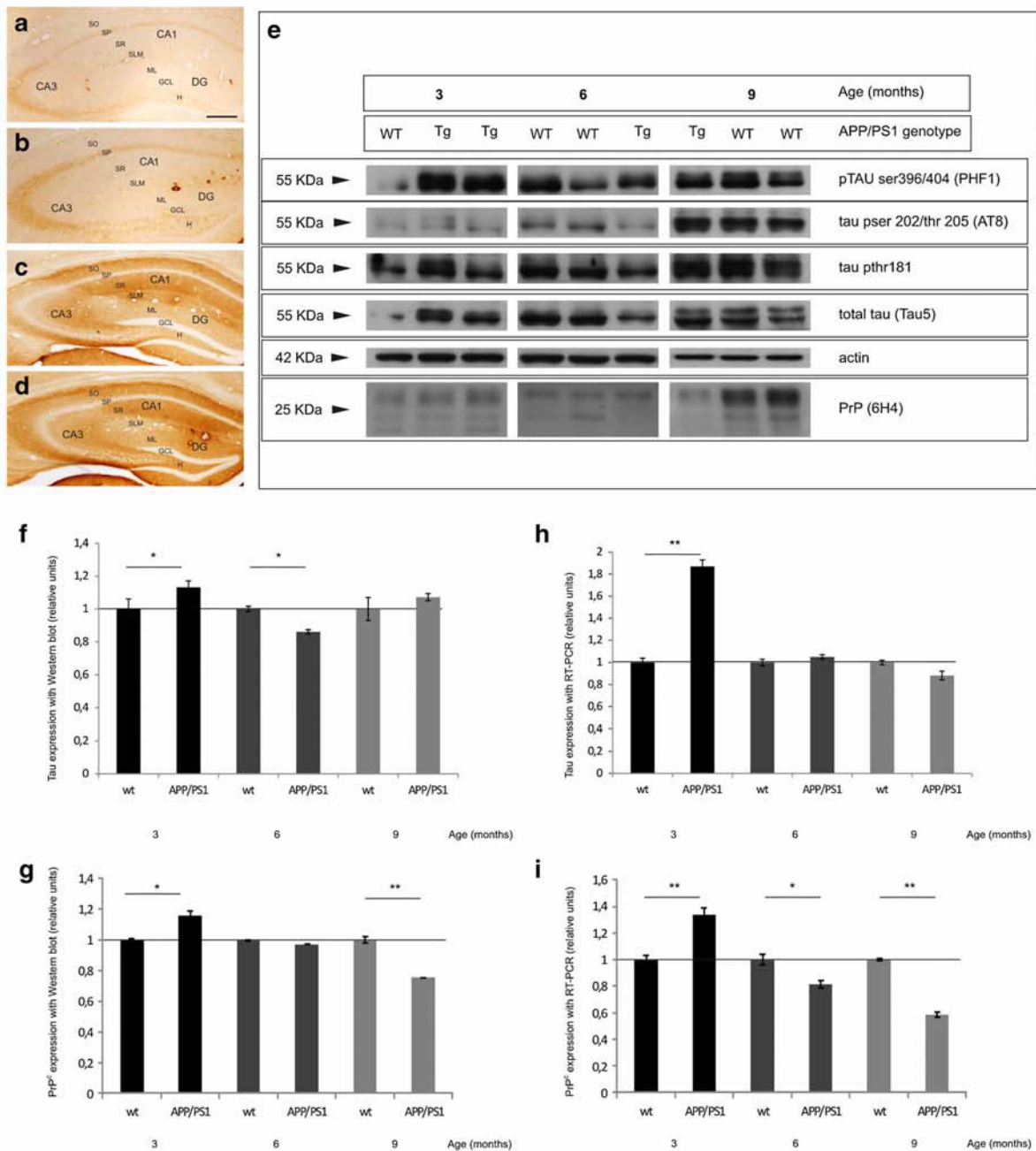
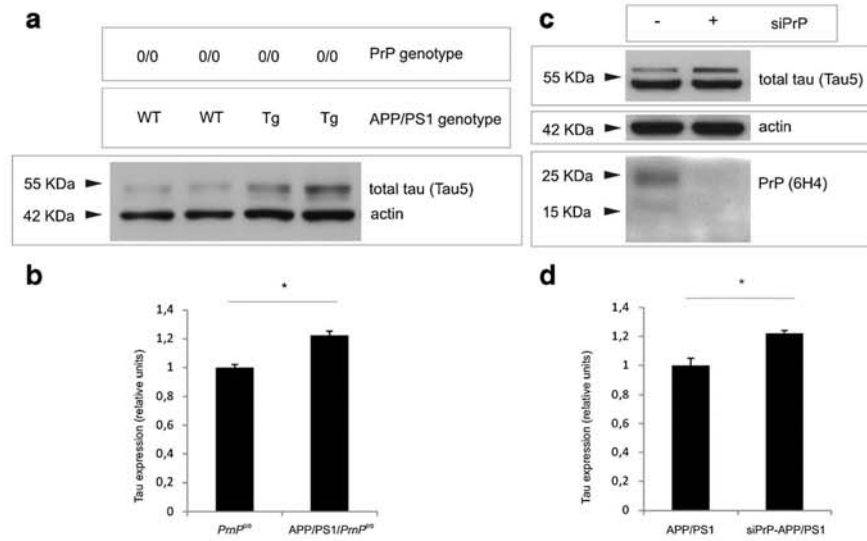


Fig. 2 a–d Immunohistochemical characterization of mouse brain sections. Anti-total tau antibody (monoclonal Tau 5) (a, b) and anti-PrP^C antibody (monoclonal 6H4) (c, d) were used to detect an increased immunoreaction in APP/PS1 mice ($n=4$) (b, d) in contrast to wild-type animals ($n=4$) (a, c). CA1 cornus ammonis I, CA2 cornus ammonis II, DG dentate gyrus, GCL granular cell layer, H hilus, ML molecular layer, SLM stratum lacunosum-moleculare, SO stratum oriens, SP stratum pyramidale, SR stratum radiatum. Scale bar=200 μ m. **e** Western blot analysis of tau and PrP^C in brains from wild-type (WT) and APP/PS1

mice (Tg) at different postnatal ages (3, 6, and 9 months, respectively). Anti-actin monoclonal antibody was used for standardization. **f, g** Histograms showing the densitometry study of each protein, tau (f) and PrP^C (g), respectively. **h, i** Histograms showing the RT-qPCR analysis of expression of each protein, tau (h) and PrP^C (i), respectively. Nine animals were examined in each case, and bars represent the mean of each group of transgenic animals normalized with control group at the same age. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (ANOVA test)

Fig. 3 **a, b** Tau expression in brains from triple transgenic mice APP/PS1/*Prnp*^{0/0} (*n*=9) compared to *Prnp*^{0/0} (*n*=9) at 9 months of age. An example of western blot analysis of two animals of each genotype (**a**) and the respective histogram quantification of tau expression (**b**). Anti-actin monoclonal antibody was used for standardization. **p*<0.05 (ANOVA test). **c, d** Cortical cultures from APP/PS1 mice after silencing PrP^C expression with a lentivirus (*n*=4). The western blot analysis showed increased levels of endogenous tau when PrP^C expression was decreased (**c**). Densitometric analysis of developed films (**d**). **p*<0.05 (ANOVA test)



effects of ADDLs in tau level modulation as well as their phosphorylation. Schmitz et al. showed that increased PrP^C expression in transfected cells decreased ptau levels (determined using AT8 antibody) [74]. This was also observed in *Prnp*^{0/0} mice (FVB background) with increased tau phosphorylation at earlier stages [72]. Similar data have described tyr¹⁸ phosphorylation of tau after ADDL treatment [41]. Our data confirm but also expand these observations to all the phospho-epitopes studied. Concerning different phospho-epitopes, it has been shown that, after Aβ oligomer treatment, wild-type primary neurons increased specifically AT8-associated

phospho-epitopes as well as those recognized with 12E8 antibody (ser^{262/356}) and 9G3 antibody (tyr¹⁸). In contrast, ser^{396/404} (PHF1 antibody) remained unaltered (i.e., [78]). In our experiments, the absence of *Prnp* increased the phosphorylation of all ptau residues analyzed: (PHF1 antibody) ser^{396/404}, (AT8 antibody) ser²⁰²/thr²⁰⁵, and (phospho-thr181 antibody) thr¹⁸¹, in contrast to *Prnp*^{+/+} and Tg20 primary cultures. In this respect, it has recently been shown that thr¹⁸¹ and ser³⁹⁶ residues act as putative PrP^C interacting domains of tau [74]. Thus, it is reasonable to consider that these residues were not phosphorylated by intracellular kinases in wild-type and Tg20 cultures after ADDL treatment.

Several studies have analyzed the putative role of PrP^C expression in the survival of various models of neurodegenerative diseases (e.g., [79, 69]). In fact, PrP^C seems not to play a crucial role in survival in Parkinson, taupathies, or APP/PS1 mouse models [79, 69]. Although tau phosphorylation was not analyzed, no differences were observed in the tangle levels in the brain parenchyma of P301L mice with different *Prnp* dosages [79]. Only one study describes in detail the propagation of tau pathology in the same mouse model [80]. In contrast, the participation of PrP^C in the appearance and evolution of the hallmarks of AD (i.e., Aβ deposits) has been reported by several laboratories [81, 82]. In fact, PrP^C was detected with immunohistochemistry close to Aβ deposits [83] and accumulated in dystrophic neurites in AD postmortem brain sections [84].

With respect to PrP^C levels, most of these studies have been focused on the changes of PrP^C protein levels in advanced stages of the disease (mainly stage III until VI) (i.e., [70]) probably due to neuronal loss [44]. In our study, we demonstrated that in APP/PS1 mouse models, as well as in postmortem AD brains (ranking from stage I to stage VI), there is an

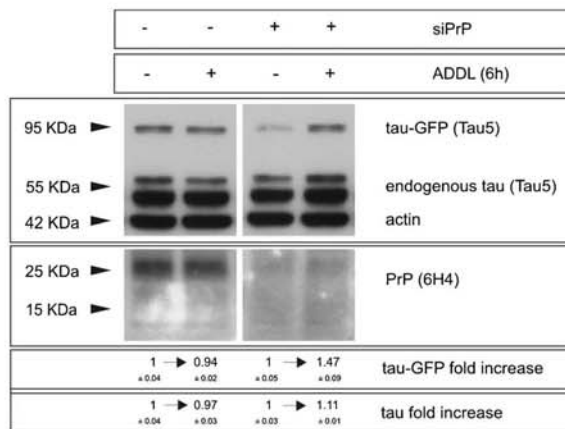


Fig. 4 Analysis of tau expression in cortical primary cultures from a triple transgenic APP/PS1/TgTP6.3 mouse. Western blot analysis shows an increase in tau expression when levels of PrP^C are reduced with lentiviral system. Both tau-GFP, which migrated to 95 KDa, and endogenous tau, around 55 KDa, are overexpressed. Anti-actin monoclonal antibody was used for standardization. Densitometric values are standardized with vehicle treatment, and quantification was represented as fold increase±SEM of three independent experiments (*n*=10 cases)

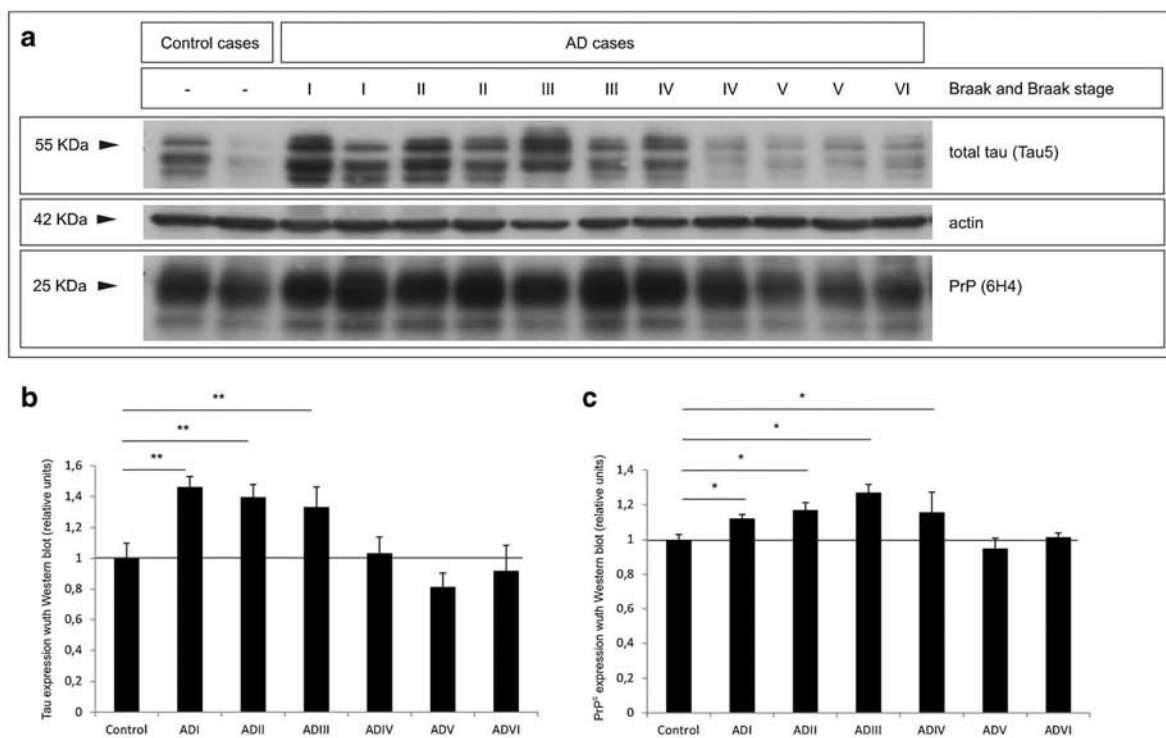


Fig. 5 Immunoblot analysis of hippocampal necropsies from AD patients compared to healthy (middle-aged adults) cases. **a** Example of western blot determination of total tau levels and PrP^C expression. Braak and Braak stage progression is indicated (I–VI). Membranes were retested with an antibody against actin for standardization. **b** Histograms

showing the densitometric study for all cases showed in Table 1. Asterisks indicate significant differences between AD groups and healthy cases, whose average represents the unit. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA test). Increased levels of tau can be seen in patients from ADI to ADIII group (**a, b**), and a correlative increment in PrP^C expression is also shown (**a, c**)

increase of PrP^C protein in the brain at early stages of the disease that peaks at around stage III in AD brains and at ~3 months old in APP/PS1 mice. Thereafter, PrP^C levels decreased inversely until the evolution of the clinical symptoms in both cases. Considering that low levels of PrP^C may increase tau expression, which may contribute to the AD pathology, and that PrP^C may act as an anti-oxidant agent as has been widely demonstrated [85, 74], it is reasonable to consider that overexpression of PrP^C in AD might be part of a protective response in the evolution of the disease.

PrP^C Expression, ADDLs, Tau Phosphorylation, and Neuroprotection

Phosphorylated form of tau protein is the main constituent of NFTs in AD and its appearance correlates with neurodegeneration in the disease (see Braak and Braak (1991) [86] revised in Avila (2010) [87]). It has been reported that the single overexpression of human tau in a mouse model is robust enough to induce tau phosphorylation [88] and neuronal aggregation [89]. In fact, the expression of a truncated form of tau reduces the excitotoxicity mediated by A β [90]. In our study, the absence of PrP^C in an APP/PS1 mouse and in

cultured APP/PS1-derived neurons led to increased tau levels. It has been described how PrP^C-Fyn complex is responsible for pathological changes induced by ADDLs in tau phosphorylation [41]. In this context, Fyn colocalizes with ser/thr phosphorylated forms of tau in AD brains [91], and a direct interaction between PrP^C and Fyn has been described [92, 41]. Furthermore, Fyn is upregulated in AD brains and it interacts with tau, phosphorylating it at tyr¹⁸ epitope [38], implicated in the formation of tau aggregates and NFTs [93]. Along these lines, we recently reported increased phosphorylation levels of tyr¹⁸ in older (~9 months) but not younger (3–6 months) APP/PS1 mice overexpressing PrP^C [69]. The data presented more recently by Larson et al., indicating a dependence of tyr¹⁸ phosphorylation on PrP^C, reinforce our previously reported data [41]. In addition, we also observed increased PrP^C in Tg20-derived cultures after ADDL treatment which may also contribute to the increased levels of ptau (tyr¹⁸) observed in our previous study [69] and the study by Larson et al. in 14-month-old mice [41]. However, we were unable to determine differences in ptau epitopes (other than tyr¹⁸) in old APP/PS1 mice with different PrP^C dosages, although we did demonstrate an increase in tau levels in APP/PS1 mice lacking PrP^C with respect to APP/PS1-Prnp^{+/-} as also reported by Larson

et al. [41]. In fact, our present results indicate that levels of PrP^C are largely reduced in APP/PS1 mice of 9 months of age by 28 % (Fig. 2). This correlates with western blotting data in human studies (see above). Taken together, these results suggest that the control of tau expression by PrP^C under the effects of ADDLs declines along the development of the disease or with age in the mouse model. This decline correlates with increased appearance of NFTs enriched in ptau in AD brains.

Are the Effects of PrP^C Mediating Tau Levels in ADDL-Treated Neurons Specific?

Our data indicate that tau levels are increased in the absence of PrP^C in the presence of ADDLs. In fact, it has been proposed that PrP^C suppresses tau transcription, probably through modulation of the Fyn pathway [75]. However, when we crossed APP/PS1 mice with a mouse model of tau overexpression under a β -actin promoter, reduction of PrP^C levels by siRNA induced increased presence of both endogenous (regulated by tau promoter) and exogenous tau-GFP (regulated by β -actin promoter) (Fig. 4). This might indicate that the absence of PrP^C also regulates the activity of different promoters or, more likely, that PrP^C may intervene in the aggregative state of the protein or its turnover. In this sense, phosphorylation of tau results in decreased tau degradation by the proteasomes that appear to play a major role in the turnover of the protein [94]. Also, cortical neurons overexpressing tau alter intracellular distribution of PrP^C and promote accumulation in the cell body, forming insoluble aggregates that in turn might damage the proteasome [95]. Taken together, these data suggest decreased degradation of tau in some pathological cases and probably modified synthesis/degradation rates. Further study is warranted to examine these possibilities and to determine biochemically whether PrP^C modulates tau levels in both healthy and AD-affected neurons.

Acknowledgments This research was supported by BESAD-P, Centro Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, for the laboratories of IF, JADR and FW. In addition, work in the laboratory of JADR was supported by grants from FP7-PRIORITY and DEMTEST (Joint Programming of Neurodegenerative Diseases, P111/03028), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (BFU2012-32617), Generalitat de Catalunya (SGR2009-366 and SGR2014-1218), and Obra Social “La Caixa”. RG was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (P111-00075) and work in FW’s lab was supported by grants from the Dirección General de Ciencia y Tecnología (DGCYT) (SAF2012-39148-C03-01), and EU-FP7-2009-(CT222887), as well as an institutional grant from the “Fundación Areces”. CV is supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN). The authors declare that they have no competing interests. We thank T. Yohannan for editorial assistance and M. Segura for technical assistance.

References

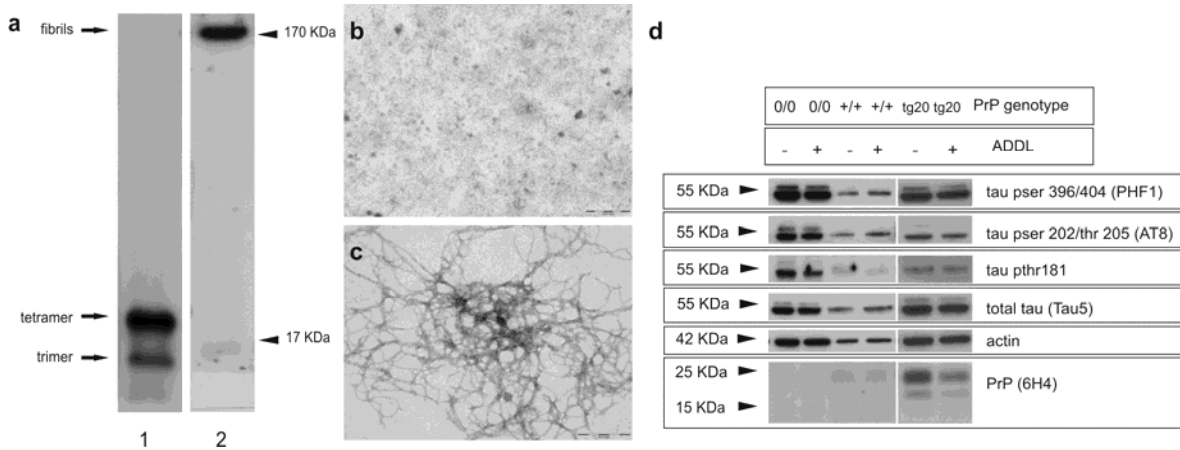
- Moleres FJ, Velayos JL (2005) Expression of PrP(C) in the rat brain and characterization of a subset of cortical neurons. *Brain Res* 1056(1):10–21. doi:10.1016/j.brainres.2005.06.067
- Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM (2002) Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 113(1):177–192
- Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B (1995) Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14(3):509–517
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772(6):629–644
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, NY)* 216(4542):136–144
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23):13363–13383
- Aguzzi A, Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89(4):1105–1152. doi:10.1152/physrev.00006.2009.89.4.1105
- Braak H, Braak E (1996) Evolution of the neuropathology of Alzheimer’s disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 165:3–12
- Avila J (2000) Tau aggregation into fibrillar polymers: tauopathies. *FEBS Lett* 476(1–2):89–92
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84(2):361–384. doi:10.1152/physrev.00024.2003
- Burack MA, Halpain S (1996) Site-specific regulation of Alzheimer-like tau phosphorylation in living neurons. *Neuroscience* 72(1):167–184
- Cruz JC, Tsai LH (2004) Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Trends Mol Med* 10(9):452–458. doi:10.1016/j.molmed.2004.07.001
- Hooper C, Killick R, Lovestone S (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer’s disease. *J Neurochem* 104(6):1433–1439. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x
- Seira O, Del Rio JA (2013) Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3beta) at the tip of neuronal development and regeneration. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-013-8571-y
- Sun X, Sato S, Murayama O, Murayama M, Park JM, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neurosci Lett* 321(1–2):61–64
- Plattner F, Angelo M, Giese KP (2006) The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 281(35):25457–25465. doi:10.1074/jbc.M603469200
- Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretschmar HA, Poser S (1997) Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 225(3):210–212
- Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, Nozaki I, Sakai K, Yamada M (2011) Serum tau protein as a marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol*. doi:10.1007/s00415-011-5960-x
- Wang GR, Shi S, Gao C, Zhang BY, Tian C, Dong CF, Zhou RM, Li XL, Chen C, Han J, Dong XP (2010) Changes of tau profiles in brains of the hamsters infected with scrapie strains 263 K or 139 A possibly associated with the alteration of phosphate kinases. *BMC Infect Dis* 10:86. doi:10.1186/1471-2334-10-86
- Perez M, Rojo AI, Wandosell F, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem J* 372(Pt 1):129–136. doi:10.1042/BJ20021596

21. Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (2009) Cdk5 acts as a mediator of neuronal cell cycle re-entry triggered by amyloid-beta and prion peptides. *Cell Cycle* 8(1):97–104
22. Nicolas O, Gavin R, del Rio JA (2009) New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev* 61(2):170–184. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.06.002
23. Osiecka KM, Nieznanska H, Skowronek KJ, Karolczak J, Schneider G, Nieznanski K (2009) Prion protein region 23–32 interacts with tubulin and inhibits microtubule assembly. *Proteins* 77(2):279–296. doi:10.1002/prot.22435
24. Wang XF, Dong CF, Zhang J, Wan YZ, Li F, Huang YX, Han L, Shan B, Gao C, Han J, Dong XP (2008) Human tau protein forms complex with PrP and some GSS- and fCJD-related PrP mutants possess stronger binding activities with tau in vitro. *Mol Cell Biochem* 310(1–2):49–55. doi:10.1007/s11010-007-9664-6
25. Alzualde A, Indakoetxea B, Ferrer I, Moreno F, Barandiaran M, Gorostidi A, Estanga A, Ruiz I, Calero M, van Leeuwen FW, Ateas B, Juste R, Rodriguez-Martinez AB, Lopez de Munain A (2010) A novel PRNP Y218N mutation in Gerstmann-Strausler-Scheinker disease with neurofibrillary degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(8):789–800. doi:10.1097/NEN.0b013e3181e85737
26. Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (New York, NY) 256(5054):184–185
27. Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10(9):698–712. doi:10.1038/nrd3505 nrd3505
28. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6448–6453
29. Bhatia R, Lin H, Lal R (2000) Fresh and globular amyloid beta protein (1–42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J: Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 14(9):1233–1243
30. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880):535–539. doi:10.1038/416535a
31. Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457(7233):1128–1132. doi:10.1038/nature07761
32. Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Lauren J, Gimbel ZA, Strittmatter SM (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30(18):6367–6374. doi:10.1523/JNEUROSCI.0395-10.2010
33. Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng H, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* (New York, NY) 316(5825):750–754. doi:10.1126/science.1141736
34. Williamson R, Usardi A, Hanger DP, Anderton BH (2008) Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB J: Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 22(5):1552–1559. doi:10.1096/fj.07-9766com
35. Klein C, Kramer EM, Cardine AM, Schraven B, Brandt R, Trotter J (2002) Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 22(3):698–707
36. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Lannay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* (New York, NY) 289(5486):1925–1928
37. Gavin R, Brann N, Nicolas O, Parra B, Urena JM, Mingorance A, Soriano E, Torres JM, Aguzzi A, del Rio JA (2005) PrP(106–126) activates neuronal intracellular kinases and Egr1 synthesis through activation of NADPH-oxidase independently of PrP^c. *FEBS Lett* 579(19):4099–4106. doi:10.1016/j.febslet.2005.06.037
38. Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, Fang SM, Do LH, Andreadis A, Van Hoesen G, Ksiazek-Reding H (2004) Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci: Off J Soc Neurosci* 24(9):2304–2312. doi:10.1523/JNEUROSCI.4162-03.2004
39. Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu GQ, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L (2011) Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31(2):700–711. doi:10.1523/JNEUROSCI.4152-10.2011
40. Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM (2012) Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15(9):1227–1235. doi:10.1038/nn.3178
41. Larson M, Sherman MA, Amar F, Nuvolone M, Schneider JA, Bennett DA, Aguzzi A, Lesne SE (2012) The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32(47):16857–16871a. doi:10.1523/JNEUROSCI.1858-12.2012
42. Um JW, Strittmatter SM (2013) Amyloid-beta induced signaling by cellular prion protein and Fyn kinase in Alzheimer disease. *Prion* 7(1):37–41. doi:10.4161/pri.22212 22212
43. Velayos JL, Irujo A, Cuadrado-Tejedor M, Paternain B, Moleres FJ, Ferrer V (2009) The cellular prion protein and its role in Alzheimer disease. *Prion* 3(2):110–117
44. McNeill A (2004) A molecular analysis of prion protein expression in Alzheimer's disease. *McGill J Med* 8:7–14
45. Rezaie P, Pontikis CC, Hudson L, Cairns NJ, Lantos PL (2005) Expression of cellular prion protein in the frontal and occipital lobe in Alzheimer's disease, diffuse Lewy body disease, and in normal brain: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 53(8):929–940. doi:10.1369/jhc.4A6551.2005
46. Griffiths HH, Whitehouse LJ, Hooper NM (2012) Regulation of amyloid-beta production by the prion protein. *Prion* 6(3):217–222. doi:10.4161/pri.18988
47. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Agnet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356(6370):577–582
48. Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring insusceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 15(6):1255–1264
49. Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9):3416–3421
50. Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17(6):157–165
51. Pratt T, Sharp L, Nichols J, Price DJ, Mason JO (2000) Embryonic stem cells and transgenic mice ubiquitously expressing a tau-tagged green fluorescent protein. *Dev Biol* 228(1):19–28. doi:10.1006/dbio.2000.9935
52. Braak H, Braak E, Bohl J, Bratzke H (1998) Evolution of Alzheimer's disease related cortical lesions. *J Neural Transm Suppl* 54:97–106

53. Huijbers W, Mormino EC, Wigman SE, Ward AM, Vannini P, McLaren DG, Becker JA, Schultz AP, Hedden T, Johnson KA, Sperling RA (2014) Amyloid deposition is linked to aberrant entorhinal activity among cognitively normal older adults. *J Neurosci* 34(15):5200–5210. doi:10.1523/JNEUROSCI.3579-13.2014
54. Abad MA, Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Ferrer I, Trullas R (2006) Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid-beta and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain. *J Neurosci* 26(49):12735–12747. doi:10.1523/JNEUROSCI.0575-06.2006
55. Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345–352
56. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685
57. Hanger DP, Gibb GM, de Silva R, Boutajangout A, Brion JP, Revesz T, Lees AJ, Anderton BH (2002) The complex relationship between soluble and insoluble tau in tauopathies revealed by efficient dephosphorylation and specific antibodies. *FEBS Lett* 531(3):538–542
58. McMillan P, Korvatska E, Poorkaj P, Evstafjeva Z, Robinson L, Greenup L, Leverenz J, Schellenberg GD, D'Souza I (2008) Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *J Comp Neurol* 511(6):788–803. doi:10.1002/cne.21867
59. Bribian A, Fontana X, Llorens F, Gavin R, Reina M, Garcia-Verdugo JM, Torres JM, de Castro F, del Rio JA (2012) Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PLoS One* 7(4):e33872. doi:10.1371/journal.pone.0033872
60. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
61. Carulla P, Bribian A, Rangel A, Gavin R, Ferrer I, Caelles C, Del Rio JA, Llorens F (2011) Neuroprotective role of PrP^C against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Mol Biol Cell* 22(17):3041–3054. doi:10.1091/mbc.E11-04-0321
62. Gotz J, Gladbach A, Penanen L, van Eersel J, Schild A, David D, Ittner LM (2010) Animal models reveal role for tau phosphorylation in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1802(10):860–871. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.008
63. De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrae PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* 29(9):1334–1347. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.029
64. Bulbarelli A, Lonati E, Cazzaniga E, Gregori M, Masserini M (2009) Pin1 affects Tau phosphorylation in response to Abeta oligomers. *Mol Cell Neurosci* 42(1):75–80. doi:10.1016/j.mcn.2009.06.001
65. Llorens F, Ferrer I, Del Rio JA (2013) Gene expression resulting from PrP ablation and PrP overexpression in murine and cellular models. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-013-8529-0
66. Nuvolone M, Kana V, Hutter G, Sakata D, Mortin-Toth SM, Russo G, Danska JS, Aguzzi A (2013) SIRPalpha polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* 210(12):2539–2552. doi:10.1084/jem.20131274
67. Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP (2006) Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{DE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 24(3):516–524. doi:10.1016/j.nbd.2006.08.017
68. Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Duff K, Howlett DR (2003) Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiol Dis* 14(1):89–97
69. Ordóñez-Gutiérrez L, Torres JM, Gavin R, Anton M, Arroba-Espinosa AI, Espinosa JC, Vergara C, Del Rio JA, Wandosell F (2013) Cellular prion protein modulates beta-amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging*. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.019
70. Llorens F, Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Zafar S, Grau-Rivera O, Lopez-Gonzalez I, Blanco R, Carmona M, Yague J, Nos C, Del Rio JA, Gelpi E, Zerr I, Ferrer I (2013) PrP mRNA and protein expression in brain and PrP in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease MM1 and VV2. *Prion* 7(5):383–393
71. Whitehouse LJ, Miners JS, Glennon EB, Kehoe PG, Love S, Kellett KA, Hooper NM (2013) Prion protein is decreased in Alzheimer's brain and inversely correlates with BACE1 activity, amyloid-beta levels and Braak stage. *PLoS One* 8(4):e59554. doi:10.1371/journal.pone.0059554
72. Benvegnu S, Roncaglia P, Agostini F, Casalone C, Corona C, Gustinich S, Legname G (2011) Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. *Physiol Genomics* 43(12):711–725. doi:10.1152/physiolgenomics.00205.2010
73. Rangel A, Madronal N, Gruart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-Garcia JM, Del Rio JA (2009) Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS One* 4(10):e7592. doi:10.1371/journal.pone.0007592
74. Schmitz M, Wulf K, Signore SC, Schulz-Schaeffer WJ, Kermer P, Bahr M, Wouters FS, Zafar S, Zerr I (2014) Impact of the cellular prion protein on amyloid-beta and 3PO-Tau processing. *J Alzheimers Dis* 38(3):551–565. doi:10.3233/JAD-130566
75. Chen RJ, Chang WW, Lin YC, Cheng PL, Chen YR (2013) Alzheimer's amyloid-beta oligomers rescue cellular prion protein induced tau reduction via Fyn pathways. *ACS Chem Neurosci*. doi:10.1021/cn400085q
76. Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science (New York, NY)* 289(5486):1925–1928
77. Zhao Y, Zhao B (2013) Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013:316523. doi:10.1155/2013/316523
78. Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2010) Abeta oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30(36):11938–11950. doi:10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010
79. Steele AD, Zhou Z, Jackson WS, Zhu C, Auluck P, Moskowitz MA, Chesselet MF, Lindquist S (2009) Context dependent neuroprotective properties of prion protein (PrP). *Prion* 3(4):240–249
80. de Calignon A, Polydorou M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spire-Jones TL, Hyman BT (2012) Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73(4):685–697. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.033
81. Schwarze-Eicker K, Keyvani K, Gortz N, Westaway D, Sachser N, Paulus W (2005) Prion protein (PrP^C) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiol Aging* 26(8):1177–1182. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.10.004
82. Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM (2007) Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26):11062–11067. doi:10.1073/pnas.0609621104
83. Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Puig B, Ribera R, Rey MJ, Ribalta T (2001) Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 101(1):49–56

84. Takahashi RH, Tobinume M, Sato Y, Sata T, Gouras GK, Takahashi H (2011) Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology* 31(3):208–214. doi:10.1111/j.1440-1789.2010.01158.x
85. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretschmar HA (1997) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146(1):104–112
86. Braak H, Braak E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1(3): 213–216
87. Avila J (2010) Intracellular and extracellular tau. *Front Neurosci* 4:49. doi:10.3389/fnins.2010.00049
88. Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P (2005) Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing non-mutant human tau isoforms. *J Neurosci* 25(22):5446–5454. doi:10.1523/JNEUROSCI.4637-04.2005
89. Spillantini MG, Goedert M (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12(6):609–622. doi:10.1016/S1474-4422(13)70090-5
90. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wolfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Gotz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142(3):387–397. doi:10.1016/j.cell.2010.06.036
91. Shirazi SK, Wood JG (1993) The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport* 4(4):435–437
92. Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Circella A, Manganelli V, Lucania G, Pavan A, Sorice M (2004) Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett* 560(1–3):14–18. doi:10.1016/S0014-5793(04)00029-8
93. Vega IE, Cui L, Propst JA, Hutton ML, Lee G, Yen SH (2005) Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Brain Res* 138(2):135–144. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.04.015
94. Poppek D, Keck S, Ermak G, Jung T, Stolzing A, Ullrich O, Davies KJ, Grune T (2006) Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochem J* 400(3):511–520. doi:10.1042/BJ20060463
95. Canu N, Filesi I, Pristera A, Ciotti MT, BioCCA S (2011) Altered intracellular distribution of PrPC and impairment of proteasome activity in tau overexpressing cortical neurons. *J Alzheimers Dis* 27(3):603–613. doi:10.3233/JAD-2011-110446

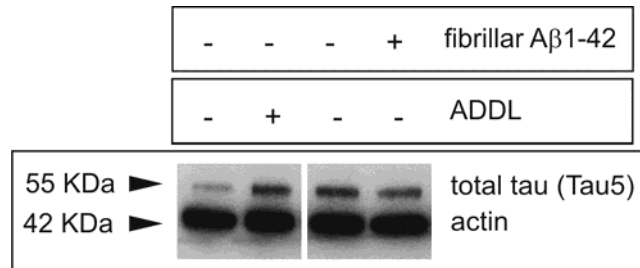
SUPPLEMENTARY FIGURE 1



Supplementary Fig. 1

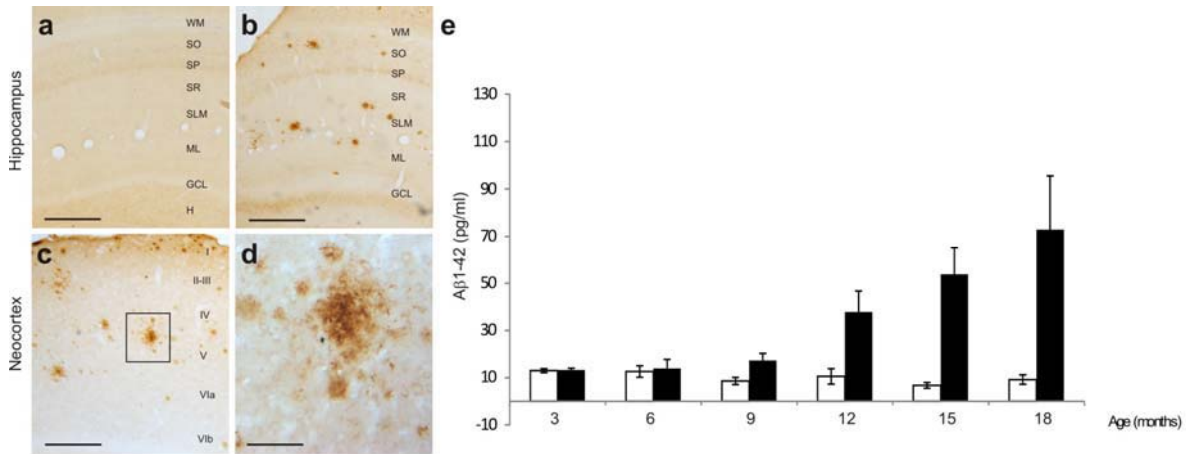
a Electrophoretic characterization of different Aβ1-42 amyloid species. Peptide was matured under protocols for ADDLs or fibril formation prior to peptide culture treatments. Immunoblot was done with 6E10 monoclonal antibody. **b, c** TEM analysis of Aβ1-42 24 hours post-dissolution under oligomer- (b) or fibril-forming conditions (c). Scale bar: 200 nm. **d** Western blot analysis of total tau level or phosphorylated tau level (epitopes ser^{396/404}, ser²⁰²/thr²⁰⁵, and thr¹⁸¹, respectively) in cortical cultures from *Prnp*^{0/0}, *Prnp*^{+/+}, and Tg20 mouse samples (n = 6, *Prnp*^{0/0}; n = 6 *Prnp*^{+/+} and n = 6 Tg20) after 24 hours of ADDL treatment.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

**Supplementary Fig. 2**

Comparative analysis of cortical primary culture from *Prnp*^{0/0} mice treated with ADDLs or fibrillar Aβ1-42, respectively, for 6 hours (n = 3 ADDLs and n = 4 Aβ1-42). Note that tau expression increases only when cells are treated with oligomers.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3



Supplementary Fig. 3

Characterization of the APP/PS1 mouse model used in this study. **a-d** Immunohistochemical analysis of 9-month-old animals with 4G8 monoclonal antibody for detection of amyloid plaques. Scale bars a, b, c = 200 μm Scale bar d = 40 μm. Abbreviations including H, hilus; GCL, granular cell layer; ML, molecular layer; SLM, stratum lacunosum-moleculare; SR, stratum radiatum; SP, stratum pyramidale; SO, stratum oriens; WM, white matter and I–VIb, neocortical layers. **a** Absence of amyloid plaques in brain sections of wild-type mice in contrast to Aβ deposits found in transgenic mice (b, c). **d** Higher magnification of the immunolabeled plaque framed in c. **e** Increasing levels of soluble Aβ1-42 amyloid with age quantified by ELISA. 9 animals were analyzed for each age.

Capítulo 3:

Molecular screening of a Cell-Penetrating *cis*- γ -Amino-L-Proline-Derived Peptides library as inhibitors of A β production

Cristina Vergara, Patricia Carulla, Daniel Carbajo, Fernando Albericio, Isidre Ferrer, Miriam Royo, Rosalina Gavín, José Antonio Del Río

Resumen:

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia, afectando a 36 millones de personas en todo el mundo. Se caracteriza por la acumulación de tau hiperfosforilada, formando ovillos neurofibrilares, y agregados del péptido β -amiloide (A β) en forma de placas. La etiología de la enfermedad se desconoce pero las formas genéticas apuntan a una desregulación del procesamiento de la proteína APP, precursora de A β . Esta proteína se procesa, en la enfermedad, por β - y γ -secretasas, dando como resultado en péptido A β .

Debido al gran impacto socioeconómico de esta patología, así como al aumento de nuevos casos año tras año, es muy importante hallar un tratamiento. Hasta la fecha, los medicamentos disponibles son paliativos y no consiguen frenar de manera permanente los síntomas de la enfermedad. Actualmente, hay una gran multitud de ensayos clínicos destinados a probar nuevas terapias más efectivas. Recientemente, han aparecido unos nuevos compuestos llamados péptidos capaces de penetrar la membrana o *cell penetrating peptides* en inglés (CPPs) que se están abriendo paso en la industria farmacéutica debido a las ventajas que aportan en comparación con otros mecanismos, como una baja toxicidad y una alta penetrabilidad en diferentes tipos celulares. En este estudio se ha testado una librería de 50 γ -péptidos ricos en prolina basados en el monómero *cis*- γ -amino-L-prolina, capaces de entrar en el interior de las células y de penetrar la barrera hematoencefálica.

En el modelo celular de células granulares de cerebelo, hemos visto un incremento de neurogénesis con algunos de los péptidos usados, que nos permitió hacer una primera preselección.

En cultivos primarios neuronales, un pequeño porcentaje de estos péptidos eran capaces de reducir los niveles del péptido A β y esta reducción estaba relacionada con una disminución de la actividad BACE1, secretasa que participa en la formación del péptido A β a partir de su proteína precursora APP.

Por último, estos resultados se corroboraron recientemente *in vivo*, inyectando intraperitonealmente el péptido que mejor resultado había mostrado en los pasos anteriores, el P33. El cerebro de estos ratones mostraba una menor producción del péptido A β , revelando que el péptido P33 podría ser un buen candidato como alternativa a las actuales terapias.

Title: Molecular screening of a Cell-Penetrating cis- γ -Amino-L-Proline-Derived Peptides library as inhibitors of A β production**Authors:**

Cristina Vergara^{1,2,3}, Patricia Carulla^{1,2,3}, Daniel Carbajo⁴, Fernando Albericio⁵, Isidre Ferrer⁶, Miriam Royo⁴, Rosalina Gavín^{1,2,3}, José Antonio Del Río^{1,2,3,*}

Affiliations:

- 1) Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute for Bioengineering of Catalonia, Barcelona, Spain.
- 2) Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
- 3) Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases, Barcelona, Spain.
- 4) Combinatorial Chemistry Unit – Barcelona Science Park, Barcelona, Spain.
- 5) Institute of Biomedical Research, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
- 6) Institute of Neuropathology, Hospital Universitari de Bellvitge

***Correspondance:**

José Antonio del Río, PhD.
Molecular and Cellular Neurobiotechnology
Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC)
Parc Científic de Barcelona
Baldiri Reixac 15-21
08028 Barcelona
phone: +34-934020296
email: jadelrio@ibeccbarcelona.eu

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. It is characterised by the accumulation of hyperphosphorylated tau forming neurofibrillary tangles, and β -amyloid peptide ($A\beta$) aggregates, amyloid plaques. The aetiology of AD pathology remains unknown, however, the genetic forms of AD point to a deregulation of the proteolysis of the Amyloid Precursor Protein (APP) resulting in the overproduction of $A\beta$. $A\beta$ peptide formation results from the amyloidogenic cleavage of APP by β - and γ -secretases in the endosomes. By contrast, nonamyloidogenic proteolysis of APP within the $A\beta$ sequence by α - and γ -secretases, releases an extracellular fragment of APP (sAPP α) together with an intracellular peptide (AICD), and mainly occurs at the plasma membrane level. Current therapeutic strategies, such as vaccination or inhibiting enzymes involved in the production of $A\beta$, have been explored but their potential is certainly limited due to numerous adverse side effects in clinical trials. One of the approaches that have been studied is the modulation of β -secretase activity, which may lead to a reduction in $A\beta$ peptide formation. Several candidates have been developed in large pharmacological screenings. However, peptides may be limited by low protease resistance and, sometimes, low membrane permeability. In the last few years, several peptides capable of crossing the cell membrane, called cell-penetrating peptides (CPPs) have been described in the literature, suggesting their potential application for drug delivery. CPPs offer several advantages over other known cellular delivery systems, including low toxicity and high penetrability in different cell lines. In this study, we have performed a screening of a singular CPPs library of *cis*- γ -amino-L-proline γ -peptide oligomers functionalized at the proline α -amine with several groups that mimic the side chains of natural amino acids, conferring some advantages over other penetrating peptides, such as being less toxic and presenting higher protease resistance. Here, we tested the peptides in different neuronal models. We found that they induced low neuronal toxicity and neurite outgrowth. Additional experiments carried out with selected peptides revealed lower $A\beta$ production in either cortical primary culture and in APP/PS1 model, by lowering BACE1 activity, with one peptide, P33, performing the best results. Our results reveal P33 peptide as a good alternative to current BACE1 inhibitors.

Keywords: Alzheimer's disease, proline derived cell penetrating γ -peptides, Amyloid beta, BACE1

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) affects 36 million people worldwide. The hallmarks of the disease are the accumulation of two misfolded proteins: amyloid beta ($A\beta$) peptide and phospho-tau. $A\beta$ is produced by an abnormal processing of its precursor protein: amyloid precursor protein (APP) (Selkoe, 2001). Moreover, Tau is a microtubule associated protein whose function is regulated by its phosphorylation state. When it becomes hyperphosphorylated at several epitopes, it detaches from the microtubules to start aggregating into paired helical filaments (PHF) and later into neurofibrillary tangles (NFT) (Braak and Braak, 1996, Avila, 2000).

Proteolytic processing of APP occurs via two alternative pathways resulting in different outcomes. APP can be proteolyzed by α - and γ -secretases in the nonamyloidogenic pathway, leading to the

formation of sAPP α and AICD peptides, which have been related with autocrine or paracrine functions (Thinakaran and Koo, 2008) and with intracellular signalling (Cao and Sudhof, 2001), respectively. During the disease evolution, APP undergoes an alternative pathway termed amyloidogenic pathway where it is proteolyzed by β -secretase first, followed by γ -secretase. The result of this pathway is the formation of A β peptide (Selkoe, 2001). After this, secreted A β peptide aggregates forming a hallmark of the disease, senile plaques, easily identifiable in post-mortem brain samples or in current *in vivo* imaging in affected patients (Burton et al., 2009). Two β -secretases acting on APP have been characterized: BACE1 and BACE2, although BACE2 has low neuronal expression (Yan and Vassar, 2014). It has been reported that in post-mortem brain tissue from AD, their activity is altered, and there is also a controversy whether their levels increase, decrease or do not change (e.g. (Johnston et al., 2005, Stockley and O'Neill, 2007)).

The widely accepted theory called “amyloid cascade” states that A β deposition in the brain parenchyma triggers a sequence of molecular events that lead to tau hyperphosphorylation and loss of function (Hardy, 2009). The highest toxicity was recently attributed to the soluble (non fibrillar) forms of A β aggregates known as oligomers (Lambert et al., 1998)(De Felice et al., 2008), and it has been reported that the severity of AD appears to correlate better with the concentration of these soluble species than with plaques (Klein et al., 2001). This suggests that a reduction in peptide production may lead to a decrease in its aggregation and so in oligomer formation. That would lead to an improvement in cognitive symptoms.

Currently available therapies for AD are mainly palliative. These therapies include acetylcholinesterase (ACh) enzyme inhibitors (AChEI) and/or NMDA receptor antagonists like Memantine (Parsons et al., 2013). Although the increase in ACh concentration in the brain has been reported for being effective in mild to moderate disease, patients don't recover the cognitive damage and it doesn't stop the disease (Yiannopoulou and Papageorgiou, 2013). In the last decades, several immunotherapies have been developed following the statement of amyloid cascade. Active and passive immunizations have been performed aiming to reduce A β deposition with different results (reviewed in (Wisniewski and Goni, 2014)).

Active immunisation approach aims to cause a humoral response leading to antibody formation towards A β peptide by the own immune system to reduce A β deposition. Studies performed in transgenic AD mice demonstrated a reduction in deposition and in the related cognitive impairments (Janus et al., 2000, Morgan et al., 2000). However, choosing the epitope used to cause this humoral response is also a tricky task as there is a risk of causing a Th-1 mediated autoimmune response. In fact, in 2002 a trial had to be stopped due to the appearance of meningoencephalitis in 6% of the patients (Gilman et al., 2005). Passive immunisation might be a good alternative. It consists on injecting pre-formed antibodies to avoid peptide aggregation or stimulate plaque clearance by microglia without inducing autoimmunity, although an immune response to them can be developed. Nevertheless, these antibodies have to be able to cross the blood brain barrier (BBB), need to be repeatedly injected in AD, and can cause haemorrhages (Wisniewski and Goni, 2014). Assays in transgenic AD mice model undergoing passive immunisation showed reduction in A β levels and an improvement in cognitive impairment (ex. (Bard et al., 2000)). Indeed, several

phase III trials are in progress and results reported no clinical improvement (summarised in (Farlow and Brosch, 2013)).

In order to overcome these difficulties, efforts have been made in improving the epitopes used for vaccination. Several ongoing trials based on active immunisation with B-cells epitopes (Winblad et al., 2012) or second generation immunisation using mimotopes (synthetic peptides mimicking specific epitopes)(Schneeberger et al., 2009) are now in Phase I/II. Results have not been reported yet. These mimic peptides provide a new tool to generate an immune response towards a specific toxic conformation, like oligomeric species, which can't be found in a control brain. However, they are based on the original sequence, still having the risk of causing cross reactivity to typical A β peptides.

In the last few years, peptides capable of penetrating the cell membrane have been reported, suggesting their potential as delivery agents for drugs. These peptides, known as cell-penetrating peptides (Lindgren et al., 2000, Lundberg and Langel, 2003), offer advantages over other systems like low toxicity or high efficiency in several cell lines (Davidson and Breakefield, 2003, Zhang et al., 2004). However, this kind of delivery presents limited use due to its low protease resistance or, sometimes, rapid degradation (Milletti, 2012). To overcome these disadvantages, a new class of foldamers was developed, the γ -peptides (Farrera-Sinfreu et al., 2004). These are oligomers mimicking natural peptides and are based on cis- γ -amino-L-proline. It has been described the capability of these peptides of adopting secondary structure in solution (Farrera-Sinfreu et al., 2005). In addition proline-rich peptides are soluble in water and are capable of being internalized by eukaryotic cells (Fernandez-Carneado et al., 2004, Farrera-Sinfreu et al., 2005).

In this study, we performed a screening of a singular chemolibrary composed of 50 proline-derived γ -peptides to reduce A β formation *in vitro* and *in vivo*. 18 of the non-cytotoxic peptides were selected for further studies to test their ability to reduce A β levels. We show that the number 33 (P33 peptide) reduced A β by affecting BACE1 activity *in vitro* and in APP/PS1 mice. Although in preclinical stages, our findings suggest that this peptide could be a good alternative to current therapies used in AD aimed to decrease A β burden.

MATERIALS AND METHODS

Mouse strains and genotyping

CD1 mice were purchased from Charles River, (France) and APP/PS1 mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). In all cases, mating day was considered the embryonic day 0 (E0), and the day of birth was considered as postnatal day 0 (P0).

For primary cultures, P5 litters from the same pregnant CD1 female were used in the cytotoxicity and axonal elongation assays. E16 embryos from six pregnant females were used in ELISA and BACE1 assays.

APP/PS1 transgenic line (B6.Cg-Tg(APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) expresses human APP carrying the *Swedish* mutation and also presenilin 1 deleted in exon 9. 13 males and females were used at 6 months of age. Mice were genotyped with the method described previously by Jankowsky et al.

(Jankowsky et al., 2001) using three primers: PrP^C sense primer (5'-cctcttggactatgtggactgatgcgg-3'), PrP^C antisense primer (5'-gtggataccctccccagcctagacc-3'), and one primer specific to the transgene (PS1: 5'-cagtggtggagcaagatg-3', APP: 5'-ccgagatctctgaaggaagatggatg-3').

All studies were performed under the guidelines and protocols of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEAA) at the University of Barcelona, and the protocol for the use of animals in this study was reviewed and approved by the CEEAA at the University of Barcelona (CEEAA approval# 329/14).

Solid-Phase Synthesis using Fmoc/Boc strategy of proline-derived γ -peptides

50 γ -peptides based on *cis*- γ -amino-L-proline were synthesized to assay their cytotoxicity and capacity to elongate neurites in cerebellar granule cells culture, and their ability in reducing amyloid- β levels in neuronal primary cultures. The strategy followed was a Fmoc/Boc combined solid-phase strategy, as described previously in other works (Farrera-Sinfreu et al., 2004).

Cerebellar granule cells cultures

Cerebellar granule cells (CGCs) were obtained from CD1 P5-P7 mouse pups. They were obtained in dissection media consisting of 0.03% KCl, 0.2% Glucose, NaHCO₃ and phenol red. Meninges were removed and cerebellums were isolated. They were sliced with a chopper at 300 μ m and then trypsinized during 15 minutes at 37°C. Normal horse serum was added to the tissue and then it was centrifuged. Cells were dissociated by trituration in 0.1 M PBS containing DNase with a polished pipette. Cells were then centrifuged and resuspended in 6 ml of dissecting media, to perform a 35% and 60% Percoll gradient. Once the cells were centrifuged, cerebellar granule cells layer formed between Percoll gradients was collected and resuspended in complete media BME supplemented with 2 mM L-glutamine, antibiotics (Pen./Strept), horse serum, fetal bovine serum and 45% glucose (Invitrogen-Life Technologies, Belgium). 150.000 cells/well were plated in 24-well plates (Nunc, Denmark) on coverslips precoated with poly-D-lysine (Sigma, MO, USA) and grown for 24 hours in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with N2 and B27 supplemented with serum. After 24 hours, serum was removed.

Primary neural cultures

Primary cultures from E16 CD1 mice were obtained in ice-cold 0.1 M PBS supplemented with 6.5 mg/ml glucose as described previously (Vergara et al., 2014). Briefly, E15-16 mouse embryo brains were dissected and washed in ice-cold 0.1 M PBS containing 6.5 mg/ml glucose. Meninges were removed and the cortical lobes isolated. Tissue was trypsinized and cells were dissociated by trituration in 0.1 M PBS containing 0.025% DNase with a polished pipette. Dissociated cells were plated at \sim 3,000 cells/mm² on plates (Nunc, Denmark) coated with poly-D-lysine (Sigma, MO, USA). The culture medium used was Neurobasal supplemented with 2 mM glutamine, 6.5 mg/ml glucose, antibiotics (Pen./Strept.), horse serum, and B27 (Invitrogen-Life Technologies, Belgium). After 24 hours, serum was removed and media was changed every 3 days. After 6 days *in vitro*, cultures were stimulated with proline-derived γ -peptides for 48 or 120 hours.

***In vitro* proline–derived γ -peptides treatment**

Three procedures were used: (I) For the cytotoxicity assay, cells were treated 2 hours after deprivation at three different concentrations: 12,5 μ M, 25 μ M and 50 μ M for 24 hours. Cells were then washed with 0.1 M PBS and double-stained with Propidium Iodide at 1 μ g/ml and Hoechst 1 μ M. Coverslips were mounted in Fluoromount™ (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). (II) For the neurite length assay, cells were treated at 25 μ M for 24 hours. Cells were then fixed with phosphate buffered 4% paraformaldehyde, pH 7.3 for 30 minutes at 4°C, double-stained with phalloidin 1 μ M and Hoechst 1 μ M, and mounted in Fluoromount™ (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Images were obtained using an Olympus BX61 microscope equipped with cooled DP72L digital camera. Neurite length in cultures was assessed following image acquisition using ImageJ software. A mean of 30 cerebellar granule cells were analysed for each condition and peptide. (III) Neural primary cultures were treated at 25 μ M for 48 or 120 hours. During this period, media was not changed. Media was collected with 1x protease inhibitor and analysed by ELISA. Cells were collected with lysis buffer or CellLytic M (Sigma) for western blot or BACE1 activity assay.

Proline–derived γ -peptides intraperitoneal injection

13 APP/PS1 animals (6 females and 7 males), were treated intraperitoneally with 0.1 M PBS (6 animals: 3 females and 3 males), or 200 μ g/kg/day of P33 peptide (7 animals: 3 females and 4 males), during 3 consecutive days. 3 days after the last administration, animals were killed and their brains were removed. Cortex and hippocampus of each mouse were dissected together and were immediately frozen at -80°C for further analysis.

Western Blot

Soluble homogenate from APP/PS1 mouse cortex brains, and cultured cells were processed for Western blot. Collected samples were homogenized in lysis buffer: 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100 or 100 mM Tris pH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, and 0.5% Sodium Deoxycolate, and in both cases with supplemental 1x protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitors as above indicated. After this, samples were centrifuged at 13000 xg for 20 minutes at 4°C. The resulting supernatant was normalized for protein content using BCA kit (Pierce). Cell extracts were boiled in Laemmli sample buffer at 96°C for 5 minutes, followed by 10% SDS-PAGE electrophoresis. They were then electrotransferred into nitrocellulose membranes for 1 hour at 4°C, 100V. Membranes were blocked with 5% non-fat milk in 0.1 M Tris-buffered saline (pH. 7.4) for 1 hour and incubated overnight in 0.5% blocking solution containing primary antibodies. After incubation with peroxidase-tagged secondary antibodies (1:2000 diluted), membranes were revealed with the ECL-plus chemiluminescence Western blot kit (Amersham-Pharmacia Biotech).

ELISA

Brain homogenates from APP/PS1 and media collected from treated neural cultures were analysed by ELISA to see the levels of amyloid- β peptide.

Brain homogenates obtained as previously described, were diluted 1:2 in standard diluent buffer and 1x protease inhibitor. Media from the previous described cultures was also analysed without diluting the sample. Amyloid burden was measured using the A β 42 Human ELISA kit (Invitrogen-Life Technologies, Belgium) following the manufacturer's protocol. Microwell plate absorbance at 450 nm was read with Opsy MR microplate reader (Dyner Technologies).

BACE1 activity

Neuronal primary culture cells treated with the peptides, were scrapped and collected after 48 or 120 hours of treatment with CelLytic M (Sigma) and 1x protease inhibitors. Samples were centrifuged at 13000 $\times g$ for 20 minutes at 4°C, and the resulting supernatant was used to assay BACE1 activity with BACE1 Activity detection kit (Sigma), following manufacturer's protocol. Microwell plate fluorimeter was set with excitation at 320 nm, and emission at 405 nm, and the measurement of fluorescence intensity signal was performed with Opsy MR microplate reader (Dyner Technologies) right after the substrate was added to get the "time zero" point. After 2 hours at 37°C, fluorescence was measured again after bringing the plate at room temperature. The percentage of cleavage was obtained following manufacturer's protocol.

Real-time quantitative PCR

Total RNA from cortical-hippocampal samples obtained from treated mice was extracted with mirVana isolation kit (Ambion, TX, USA). Purified RNAs were used to generate the corresponding cDNAs required as templates for the RT-qPCR amplification. The primers used in this study were: 5'-agcaaaccaccaagtggagga-3' and 5'-gctggcaccactagttggtt-3' for mouse TNF α ; 5'-ttgtggctgtggagaagctgt-3' and 5'-aacgtcacacaccagcaggtt-3' for mouse IL1 β (Selvaraj et al., 2009). PCR reaction was performed with Roche LightCycler 480 detector, using 2x SYBR Green master Mix (Roche) as reagent, following manufacturer's protocol. Reaction consisted in a denaturation-activation cycle (95°C for 10 minutes) followed by 40 cycles of denaturation-annealing-extension (95°C for 10 seconds, 55°C for 15 seconds and 72°C for 20 seconds). mRNA levels were quantified using LightCycler 480 software. Data were analyzed with SDS 1.9.1 Software (Applied Biosystems, USA) following the 2- $\Delta\Delta$ CT method of Applied Biosystems (Livak and Schmittgen, 2001). Results were normalized by the expression levels of the housekeeping gene, gapdh (5'-aggtcggtgtgaacggattg-3') and (5'-tgttagaccatgtagttgaggtca-3'), which were quantified simultaneously with the target gene (Carulla et al., 2011).

Densitometry and Statistical analysis

Western Blots were quantified from revealed films scanned at 2400x2400 dpi (i800 Microtek high-quality film scanner, Hsinchu, Taiwan). Densitometric analysis was performed using Image J software.

Statistical analysis of the resulting data was performed using STATGRAPHICS Plus 5.1 program using Student *t*-test. Asterisks appearing in the figures indicate the following p-values: (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p < 0.001.

RESULTS

Proline-derived γ -peptide cytotoxicity and axonal elongation in CGCs

Proline-rich peptides can be solubilized in water and internalized by eukaryotic cells. Previous studies reported their cell uptake properties in COS-1 and HeLa cells, and also their low cytotoxicity in the same cell lines (Farrera-Sinfreu et al., 2005). In this study, 50 of these proline-rich peptides were tested in CGC culture to define their toxicity and their capacity to elongate axons in these cells.

Toxicity was determined 1 day after stimulation with the γ -peptides in three different concentrations: 12.5 μ M, 25 μ M and 50 μ M, being 25 μ M the same used in previous studies (Farrera-Sinfreu et al., 2005). The technique consisted in double-staining the cells with Hoechst, and propidium iodide, an apoptosis marker (fig. 1). Those cells positive for both markers were counted as dead. Table 1 shows the results for the whole library of γ -peptides at each concentration used. Results show a dose-dependent tendency in most cases, as toxicity was higher at the highest concentration used, but there were minimum differences between the two lowest concentrations used in most of the γ -peptides (figure 1b). Among the three different concentrations, the one selected was 25 μ M to perform further studies, as there were minimal differences between this one and the lowest one, and even in some γ -peptides, toxicity was lower at this concentration (table 1).

The next step was to test axonal elongation in the same cell type, using the concentration of γ -peptides chosen in the earlier step. Cells were plated in a lower density, and γ -peptides were added to media to see their capacity to elongate cells' axons (fig. 2). All γ -peptides were tested in the same conditions and an approximate number of 30 phalloidine-positive cerebellar axons were analyzed per condition (figure 2a). Results obtained directly with Image J software were converted to μ m to estimate the length of the axons in comparison with PBS (figure 2b), and the results for the whole library are shown in table 2. Surprisingly, some of the γ -peptides inducing the highest levels of cytotoxicity (e.g. P16: 8.71 ± 0.79 ; P33: 2.94 ± 0.31 ; P39: 2.51 ± 0.39 ; PBS: 1.00 ± 0.00), were able to produce an average of 20% increase in axonal length (e.g. P16: 1.17 ± 0.06 ; P33: 1.18 ± 0.15 ; P39 1.15 ± 0.09 ; PBS: 1.00 ± 0.00). Other γ -peptides like P24 showed lower levels of toxicity (1.31 ± 0.42), and induced one of the highest elongation value seen in CGCs (1.42 ± 0.19).

From both assays, 18 γ -peptides were selected based mainly on their axonal elongation ability (fig. 2) for further assays.

Reduction of amyloid-beta production in neuronal primary cultures treated with selected γ -peptides is mediated by a reduction of BACE1 activity

Soluble levels of A β peptides and its oligomeric forms correlate much better with the degree and cognitive deficits of Alzheimer's disease than the plaques themselves do (Klein, 2002). Biochemical determination of these soluble species by ELISA or Western Blot has enabled a more precise evaluation of amyloid species and its quantity.

Cortical neurons from CD1 mice at E16 were first plated in three different densities to follow the progression of A β release in the media under natural amyloidogenic APP processing. Samples were collected at 3 different days: 8, 11 and 15 days *in vitro* (DIV). An ELISA against A β 1-42 peptide was performed with the media collected, using different dilutions of the samples (data not

shown). 2 days were selected to perform the following experiments with the peptides: 8 and 11 DIV, as the release get its peak within these two times. A cell density number was also established (data not shown).

Neuronal primary cultures were then plated at the chosen density and 18 γ -peptides previously selected were tested at a concentration of 25 μ M at day 6 *in vitro*. 48 or 120 hours later, media was collected to perform again an ELISA against A β 1-42 peptide showing the amount of peptide released to the media during the treatment, compared to PBS, at 8 or 11 DIV (fig. 3a). All the γ -peptides reduced the amount of A β released at 11 DIV compared to the control. Again, P24 was the one that showed better results (0.34 ± 0.12) compared to PBS (1.00 ± 0.08), although P33 (0.38 ± 0.09) and P39 (0.45 ± 0.02) were close. At DIV8, P7 and P16 were unable to reduce the amount of peptide released compared to PBS, as they showed an increase of 15-20% in A β levels (fig. 3a).

To ensure that the decrease in amyloid levels was not related with an increase in cell death, cells were also collected at 8 DIV to test the toxicity of the γ -peptides in this kind of culture by Western Blot for cleaved caspase 3 (fig. 3b). Some γ -peptides like P58, P67, or P69 reduced the amount of A β -peptide released to media between 30% and 50% (fig. 3a), but this also correlated with an increase in cleaved caspase-3 levels (fig. 3b), indicating an increase in neuronal death that could be the cause of this reduction. Others, like P7 or P16 showed toxicity levels 10% below the control.

Next, we wanted to know whether these γ -peptides were affecting the process of A β 1-42 production. This peptide comes from an abnormal processing of its precursor protein amyloid precursor protein (APP) by two complexes of secretases, being BACE1 a part of them (Selkoe, 2001). One way of preventing or reducing the amount of peptide produced would be by inhibiting BACE1 activity.

According to the results explained above these lines, 4 γ -peptides were selected based on the reduction of A β 1-42 peptide released and the health of the cultures. These selected γ -peptides were used to perform an assay to test BACE1 activity in the same type of culture, at both DIV used previously. Results displayed in figure 4 showed a reduction of 20% in BACE1 substrate cleavage with peptides P24 and P39 at both 8 and 11 DIV. P7 didn't show any reduction at 8 DIV but the cleavage was the same as in the other peptides at 11 DIV. Peptide P33, however, was the best one in reducing the activity of the enzyme, showing 50% less cleavage at both DIV (fig. 4).

Acute intraperitoneal P33 injection induced a significant reduction of A β levels in APP/PS1 brain

A lack of a functional therapy for Alzheimer's disease has enhanced the research performed in this field in the last decades. A lot of knowledge has been collected and some approaches like A β therapies have been developed, but the main problem implied in these therapies is a possible side-effect: an autoimmune reaction (reviewed in (Wisniewski and Goni, 2014)).

In this study, we aimed to find an alternative to these therapies by simply applying a systemic treatment composed of a peptide capable of crossing the blood brain barrier (BBB). P33 peptide was selected to perform an acute treatment in thirteen APP/PS1 mice that were 6 months old, and 0.1 M PBS was used as vehicle. Polytroned and homogenized brains were analysed by ELISA and

Western Blot (figure 5). ELISA showed a significant reduction in A β levels in the brain of the animals treated with P33 (0.42 ± 0.04), compared to the ones treated with vehicle (1.00 ± 0.06) (fig. 5a).

Alzheimer's disease is characterised by impairments in the cholinergic and glutamatergic systems, involved in processes like memory and learning (Parsons et al., 2013). Dysfunction in the glutamatergic system may lead to extended neuronal loss that can lower the levels of amyloid beta in the brain. WB for cleaved caspase 3 was performed to assess whether this reduction was related with an increase in cell death. Results don't show any increase in cell death in the brain of the animals treated with the peptide compared to the control ones (fig 5c-d), suggesting that the levels were lowered by a mechanism derived from the peptide.

Finally, the safety of the peptide was assessed by measuring the expression of inflammatory cytokines. Quantitative real-time PCR was performed in mRNA samples of the animals treated to test the inflammation caused by the treatment by measuring TNF α and IL1 β expression levels. Results didn't notice a significant increase in any of the genes analysed (fig. 5b).

DISCUSSION

Improvements in diagnosing AD at previous stages and in its therapies need to be done. If therapies are applied in mild to final stages, amyloid plaques can be reduced but there is no improvement in cognitive impairment (Holtzman et al., 2012). Moreover, amyloid therapies may only be focus in one part of the problem, as no effects on tau pathology are normally seen. A double-treatment therapy addressing the two main hallmarks may be a better alternative, but as currently amyloid therapies are based on the original A β sequence, there is a risk of cross-reactivity (Wisniewski and Goni, 2014). Here we present a γ -peptide showing a reduction in A β levels in a mouse model of the disease that could be a good alternative to use in a double-treatment approach.

In this study we have performed a screening of a chemical library formed by 50 γ -peptides. Our experiments using some of these peptides have revealed their potential in axonal elongation and in reducing A β levels *in vitro* and *in vivo*, without affecting cell viability, becoming a potential treatment for the disease.

First screening of γ -peptides in CGCs: cytotoxicity and axonal elongation

Primary CGCs cultures have long been used in the study of neuronal apoptosis or cell survival, and to study molecules related with apoptotic processes found in neurodegenerative diseases (reviewed in (Contestabile, 2002) and (Canu and Calissano, 2003)). In fact, previous studies also reported the use of CGCs to identify new CPPs (Sheng et al., 2009).

According to this, γ -peptides were first tested in a culture of CGCs to examine their toxicity and find the best dose. Although previous studies using HeLa and COS cells were performed to assess the toxicity of these peptides at 25 μ M (Farrera-Sinfreu et al., 2005), we established three different treatment conditions to see which one was the optimal for this neural model. Starting with the one previously reported 25 μ M, two other concentrations above (50 μ M) and below (12.5 μ M) were also set and used. Results showed that there were minimum differences between the two lower doses, and that in some cases peptides were less toxic at 25 μ M (Fig. 1b and Table 1).

In a second set of experiments we determined that some of these γ -peptides enhanced the neurite outgrowth. In fact, although we did not determine the molecular mechanism involved in this effect, results suggest that the application of the peptides in animal models may have two actions, first acting on BACE activity as well as in neuronal survival and neuritogenesis, both aspects decreased in AD patients.

γ -peptides reduce amyloid beta levels by reducing BACE1 activity in neuronal primary cultures

It has been reported in animal models of AD that A β starts to deposit in earlier stages of the disease, at 4 months of age (Garcia-Alloza et al., 2006), and the amount of A β peptide increases with age in these animals (Vergara et al., 2014). Hence, a reduction in its production may lead to less deposition and so a general improvement in these mice.

A total of 16 candidates from the initial library were chosen to test their ability in reducing amyloid burden in neuronal primary cultures from neocortex and hippocampus. Neurons comprised in these two areas are the most affected neurons in AD affected brains (Braak and Braak, 1995). Several approaches have been tested to reduce the amyloid burden in AD brains (e.g. (Hong-Qi et al., 2012)), some of them leading to meningoencephalitis after treatment (Pride et al., 2008). Our peptides emerge as a good alternative to the peptides used for active immunisation to date, as they don't rely on a natural peptidic sequences, so avoiding the risk of causing an autoimmune response.

ELISA analysis performed with media samples after peptide treatment showed lowered levels of A β 42 peptide. This peptide, present in AD brains, is the one more prone to aggregate and form deposits (Yan and Wang, 2006). Among all the candidates, the peptide number 33 performed better than the others. Our results show promising perspectives as this P33 peptide was able to lower amyloid levels, specifically A β 42. Moreover, toxicity assay using western blot to detect caspase 3 demonstrated that in most cases, the decrease in A β was not due to cell death.

The mechanism by which γ -peptides reduced amyloid levels was unknown, so we wondered whether they could regulate these levels by modifying BACE1 enzyme. Four peptides were selected to study BACE1 activity. BACE1 activity assay revealed that almost all the peptides selected were able to reduce its activity, but P33 was the one performing better, reducing significantly up to 50% the cleavage of the substrate. Further experiments are now being developed in our group to know if γ -peptides interact directly with the enzyme or whether it is an indirect mechanism.

P33 γ -peptide injected intraperitoneally reduced of amyloid burden in the brain of APP/PS1 mice

Peptidomimetic BACE1 first generation inhibitors have been developed but lack some of the properties required to be used *in vivo*, like oral bioavailability or long-serum half-life or BBB penetration (Yan and Vassar, 2014). Second and third generation inhibitors still lack some of this properties. There are a few ongoing clinical trials that are testing several of these BACE1 inhibitors with encouraging results in reducing A β levels in plasma and CSF (e.g. (Forman et al., 2012, Forman et al., 2013)), but others had to be stopped due to adverse effects (May et al., 2011) (reviewed in (Yan and Vassar, 2014)).

In vivo studies were performed to corroborate our *in vitro* data. Encouraging results in reducing amyloid burden, without causing significant brain inflammatory response, were obtained by injecting the previous selected P33 peptide intraperitoneally into a mouse model of the disease: APP/PS1. APP/PS1 is a model that carries the *Swedish* mutation (Lys670Asn, Met671Leu) located near the β -secretase cleavage site, and it increases the efficiency of β -secretase processing of APP leading to an increase in C99 and total A β production (Griffiths et al., 2011).

Further experiments would be performed to know the pharmacokinetic properties of the peptide, to elucidate the mechanism of inhibition, to establish the best dose and the pattern of administration to obtain a sustained response.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Analysis of the cytotoxicity derived from peptide treatment in CGCs. Cerebellar granule cells from CD1 mice were plated and treated with either the peptides at three different concentrations, or the vehicle, PBS. (a) Photomicrographs illustrating staining of primary CGC culture with Hoechst and Propidium iodide 1 day after stimulation with some γ -peptides at 25 μ M to differentiate the amount of alive cells in each condition. There is a dose-dependent tendency in most cases, with more concentration causing more cytotoxicity. (b) Analysis and quantification of the cytotoxicity exerted by all the peptides at the three different concentrations tested. PBS was taken as the unit. Results represented as a fold change, show minimum differences between the lower doses.

Figure 2. Analysis of the axonal elongation after peptide treatment. Cerebellar granule cells from CD1 mice were plated at low density and treated again with either the peptides at 25 μ M, or the vehicle, PBS. (a) Photomicrographs illustrating some phalloidine-positive CGCs axons after 24 hour of peptide treatment at 25 μ M. Representative images of 5 peptides of the whole library are shown. (b) Relative quantification analysis of the elongation performed by a selection of peptides on CGCs axons compared to PBS. PBS was taken as the unit and results are shown as a fold change. An average of 30 CGCs were analysed per condition.

Figure 3. Amyloid- β and caspase-3 levels. Neuronal primary culture from E15-16 CD1 embryos were plated and treated with previously selected peptides (25 μ M) or vehicle, PBS, for 48 or 120 hours. (a) ELISA analysis of A β 42 peptide levels secreted in the media collected at 8 and 11 days *in vitro*. Some peptides show a reduction of amyloid levels compared to PBS, which was taken as the unit. (b) Western blot analysis of caspase-3 and cleaved caspase 3 levels in the same cultures to test the cytotoxicity caused by peptide treatment. An antibody against tubulin was used for normalization. Peptides 71 and 103 caused excessive cell death, as there is a few amount of protein remaining in the membrane.

Figure 4. BACE1 activity. Neuronal primary culture from E15-16 CD1 embryos were stimulated with either selected peptides (25 μ M) or PBS. Cells were collected to analyse BACE1 activity using a fluorimetric assay. PBS was taken as the unit and results are shown as the fold change. Significant results were obtained concerning P33 peptide, although P24 and P39 performed well too. Asterisks indicate statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t-test).

Figure 5. *In vivo* assay performed with P33 peptide in APP/PS1. P33 peptide was injected intraperitoneally at 200 μ g/kg/day in 7 APP/PS1 mice of 6 months together with 6 APP/PS1 animals that were treated with PBS as the vehicle, for 3 days. 6 days after the first administration, their brains were collected and processed. (a) A β 42 levels were analysed by ELISA performed with soluble cortical and hippocampal brain extracts. Results show a significant decrease in the peptide levels in those animals treated with the peptide. (b) Inflammatory response derived from the treatment was analysed by measuring TNF α and IL1 β mRNA levels by RT-qPCR, with RNA extracted from the treated animals. There is no significant result, suggesting no inflammatory response. (c)

Caspase-3 and cleaved caspase-3 levels were assessed from soluble brain extracts. Any of the animals showed an activation of caspase-3, suggesting no cytotoxicity was induced because of the treatment. (d) Densitometric analysis of cleaved caspase-3 levels. Asterisks indicate statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t-test).

REFERENCES

- Avila, J. (2000). "Tau aggregation into fibrillar polymers: taupathies." *FEBS Lett* **476**(1-2): 89-92.
- Bard, F., C. Cannon, et al. (2000). "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease." *Nat Med* **6**(8): 916-919.
- Braak, H. and E. Braak (1995). "Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes." *Neurobiol Aging* **16**(3): 271-278; discussion 278-284.
- Braak, H. and E. Braak (1996). "Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease." *Acta Neurol Scand Suppl* **165**: 3-12.
- Burton, E. J., R. Barber, et al. (2009). "Medial temporal lobe atrophy on MRI differentiates Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies and vascular cognitive impairment: a prospective study with pathological verification of diagnosis." *Brain* **132**(Pt 1): 195-203.
- Canu, N. and P. Calissano (2003). "In vitro cultured neurons for molecular studies correlating apoptosis with events related to Alzheimer disease." *Cerebellum* **2**(4): 270-278.
- Cao, X. and T. C. Sudhof (2001). "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." *Science* **293**(5527): 115-120.
- Carulla, P., A. Bribian, et al. (2011). "Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding." *Mol Biol Cell* **22**(17): 3041-3054.
- Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." *Cerebellum* **1**(1): 41-55.
- Coulson, D. T., N. Beyer, et al. (2010). "BACE1 mRNA expression in Alzheimer's disease postmortem brain tissue." *J Alzheimers Dis* **22**(4): 1111-1122.
- Davidson, B. L. and X. O. Breakefield (2003). "Viral vectors for gene delivery to the nervous system." *Nat Rev Neurosci* **4**(5): 353-364.
- De Felice, F. G., D. Wu, et al. (2008). "Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers." *Neurobiol Aging* **29**(9): 1334-1347.
- Deng, Q., W. Cai, et al. (2013). "Small Nogo-66-binding peptide promotes neurite outgrowth through RhoA inhibition after spinal cord injury." *Brain Res Bull* **99**: 140-144.
- Ewers, M., X. Cheng, et al. (2011). "Increased CSF-BACE1 activity associated with decreased hippocampus volume in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **25**(2): 373-381.
- Farlow, M. R. and J. R. Brosch (2013). "Immunotherapy for Alzheimer's disease." *Neurol Clin* **31**(3): 869-878.
- Farrera-Sinfreu, J., E. Giralt, et al. (2005). "Cell-penetrating cis-gamma-amino-L-proline-derived peptides." *J Am Chem Soc* **127**(26): 9459-9468.
- Farrera-Sinfreu, J., L. Zaccaro, et al. (2004). "A new class of foldamers based on cis-gamma-amino-L-proline." *J Am Chem Soc* **126**(19): 6048-6057.
- Fernandez-Carneado, J., M. J. Kogan, et al. (2004). "Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein." *Angew Chem Int Ed Engl* **43**(14): 1811-1814.
- Forman, M., H.-J. Kleijn, et al. (2013). "The novel BACE inhibitor MK-8931 dramatically lowers CSF beta-amyloid in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* **9**(4): P139.
- Forman, M., J. Palcza, et al. (2012). "The novel BACE inhibitor MK-8931 dramatically lowers cerebrospinal fluid A β peptides in healthy subjects following single- and multiple-dose administration." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* **8**(4): P704.
- Garcia-Alloza, M., E. M. Robbins, et al. (2006). "Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease." *Neurobiol Dis* **24**(3): 516-524.
- Ghoshal, N., F. Garcia-Sierra, et al. (2002). "Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Exp Neurol* **177**(2): 475-493.
- Gilman, S., M. Koller, et al. (2005). "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial." *Neurology* **64**(9): 1553-1562.
- Griffiths, H. H., I. J. Whitehouse, et al. (2011). "Prion protein interacts with BACE1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and Swedish mutant amyloid precursor protein." *J Biol Chem* **286**(38): 33489-33500.
- Hardy, J. (2009). "The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal." *J Neurochem* **110**(4): 1129-1134.

- Holtzman, D. M., E. Mandelkow, et al. (2012). "Alzheimer disease in 2020." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(11).
- Hong-Qi, Y., S. Zhi-Kun, et al. (2012). "Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Abeta and tau." Transl Neurodegener **1**(1): 21.
- Jankowsky, J. L., H. H. Slunt, et al. (2001). "Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies." Biomol Eng **17**(6): 157-165.
- Janus, C., J. Pearson, et al. (2000). "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 979-982.
- Johnston, J. A., W. W. Liu, et al. (2005). "Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 1096-1100.
- Klein, W. L. (2002). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets." Neurochem Int **41**(5): 345-352.
- Klein, W. L., G. A. Krafft, et al. (2001). "Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?" Trends Neurosci **24**(4): 219-224.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6448-6453.
- Le, R., L. Cruz, et al. (2001). "Plaque-induced abnormalities in neurite geometry in transgenic models of Alzheimer disease: implications for neural system disruption." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 753-758.
- Lindgren, M., M. Hallbrink, et al. (2000). "Cell-penetrating peptides." Trends Pharmacol Sci **21**(3): 99-103.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lundberg, P. and U. Langel (2003). "A brief introduction to cell-penetrating peptides." J Mol Recognit **16**(5): 227-233.
- May, P. C., R. A. Dean, et al. (2011). "Robust central reduction of amyloid-beta in humans with an orally available, non-peptidic beta-secretase inhibitor." J Neurosci **31**(46): 16507-16516.
- Milletti, F. (2012). "Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape." Drug Discov Today **17**(15-16): 850-860.
- Morgan, D., D. M. Diamond, et al. (2000). "A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 982-985.
- Muhs, A., D. T. Hickman, et al. (2007). "Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9810-9815.
- Parsons, C. G., W. Danysz, et al. (2013). "Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease." Neurotox Res **24**(3): 358-369.
- Pride, M., P. Seubert, et al. (2008). "Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis." Neurodegener Dis **5**(3-4): 194-196.
- Schneeberger, A., M. Mandler, et al. (2009). "Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)--from concept to clinical testing." J Nutr Health Aging **13**(3): 264-267.
- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiol Rev **81**(2): 741-766.
- Selvaraj, V., M. M. Soundarapandian, et al. (2009). "PARP-1 deficiency increases the severity of disease in a mouse model of multiple sclerosis." J Biol Chem **284**(38): 26070-26084.
- Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, et al. (2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): a006189.
- Sheng, J., G. Oyler, et al. (2009). "Identification and characterization of a novel cell-penetrating peptide." Biochem Biophys Res Commun **382**(2): 236-240.
- Staberg, M., C. Riemer, et al. (2013). "Identification of a novel antagonist of the ErbB1 receptor capable of inhibiting migration of human glioblastoma cells." Cell Oncol (Dordr) **36**(3): 201-211.
- Stockley, J. H. and C. O'Neill (2007). "The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain." Biochem Soc Trans **35**(Pt 3): 574-576.
- Stokin, G. B. and L. S. Goldstein (2006). "Axonal transport and Alzheimer's disease." Annu Rev Biochem **75**: 607-627.
- Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem **283**(44): 29615-29619.
- Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science **286**(5440): 735-741.

- Vergara, C., L. Ordonez-Gutierrez, et al. (2014). "Role of PrP Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution." Mol Neurobiol.
- Vickers, J. C., D. Chin, et al. (1996). "Dystrophic neurite formation associated with age-related beta amyloid deposition in the neocortex: clues to the genesis of neurofibrillary pathology." Exp Neurol **141**(1): 1-11.
- Winblad, B., N. Andreasen, et al. (2012). "Safety, tolerability, and antibody response of active Abeta immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study." Lancet Neurol **11**(7): 597-604.
- Wisniewski, T. and F. Goni (2014). "Immunotherapy for Alzheimer's disease." Biochem Pharmacol **88**(4): 499-507.
- Yan, R. and R. Vassar (2014). "Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy." Lancet Neurol **13**(3): 319-329.
- Yan, Y. and C. Wang (2006). "Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity." J Mol Biol **364**(5): 853-862.
- Yiannopoulou, K. G. and S. G. Papageorgiou (2013). "Current and future treatments for Alzheimer's disease." Ther Adv Neurol Disord **6**(1): 19-33.
- Zhang, S., Y. Xu, et al. (2004). "Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery." J Control Release **100**(2): 165-180.
- Zhao, J., Y. Fu, et al. (2007). "Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis." J Neurosci **27**(14): 3639-3649.

FIGURE 1

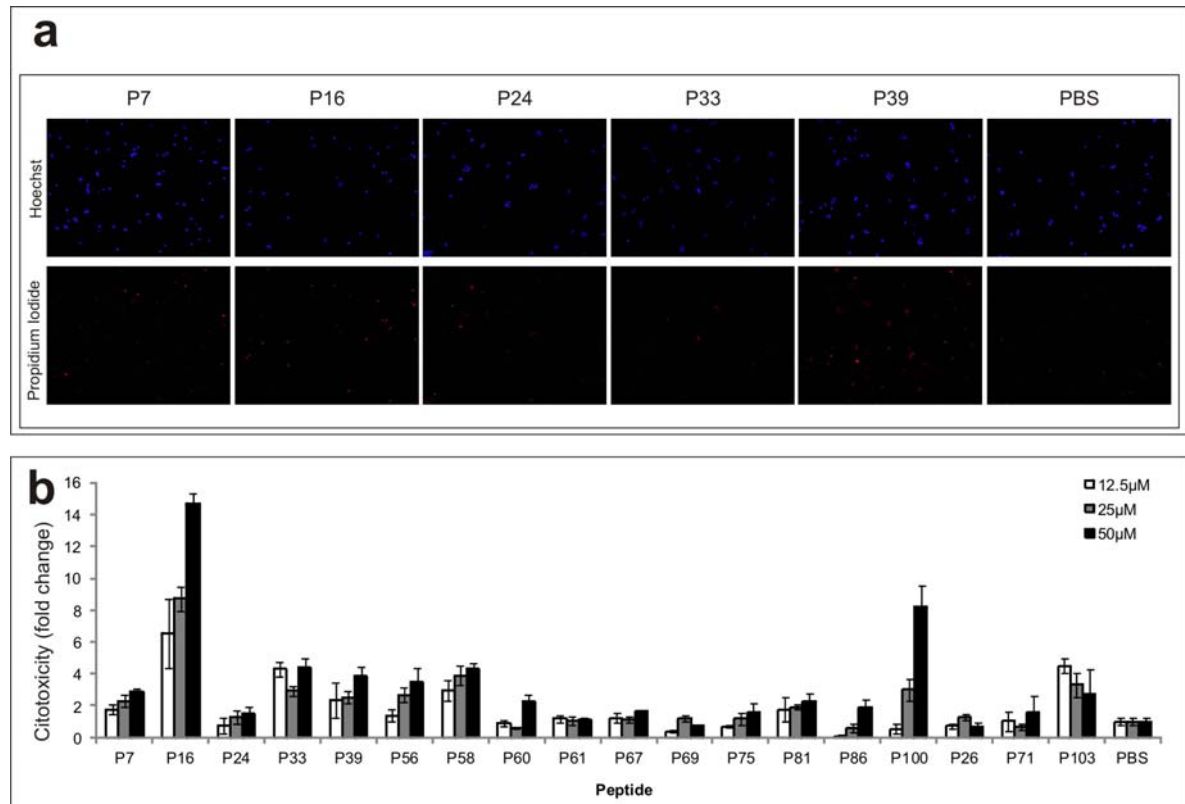


Figure 1. Analysis of the cytotoxicity derived from peptide treatment in CGCs. Cerebellar granule cells from CD1 mice were plated and treated with either the peptides at three different concentrations, or the vehicle, PBS. (a) Photomicrographs illustrating staining of primary CGC culture with Hoechst and Propidium iodide 1 day after stimulation with some γ -peptides at 25 μ M to differentiate the amount of alive cells in each condition. There is a dose-dependent tendency in most cases, with more concentration causing more cytotoxicity. (b) Analysis and quantification of the cytotoxicity exerted by all the peptides at the three different concentrations tested. PBS was taken as the unit. Results represented as a fold change, show minimum differences between the lower doses.

FIGURE 2

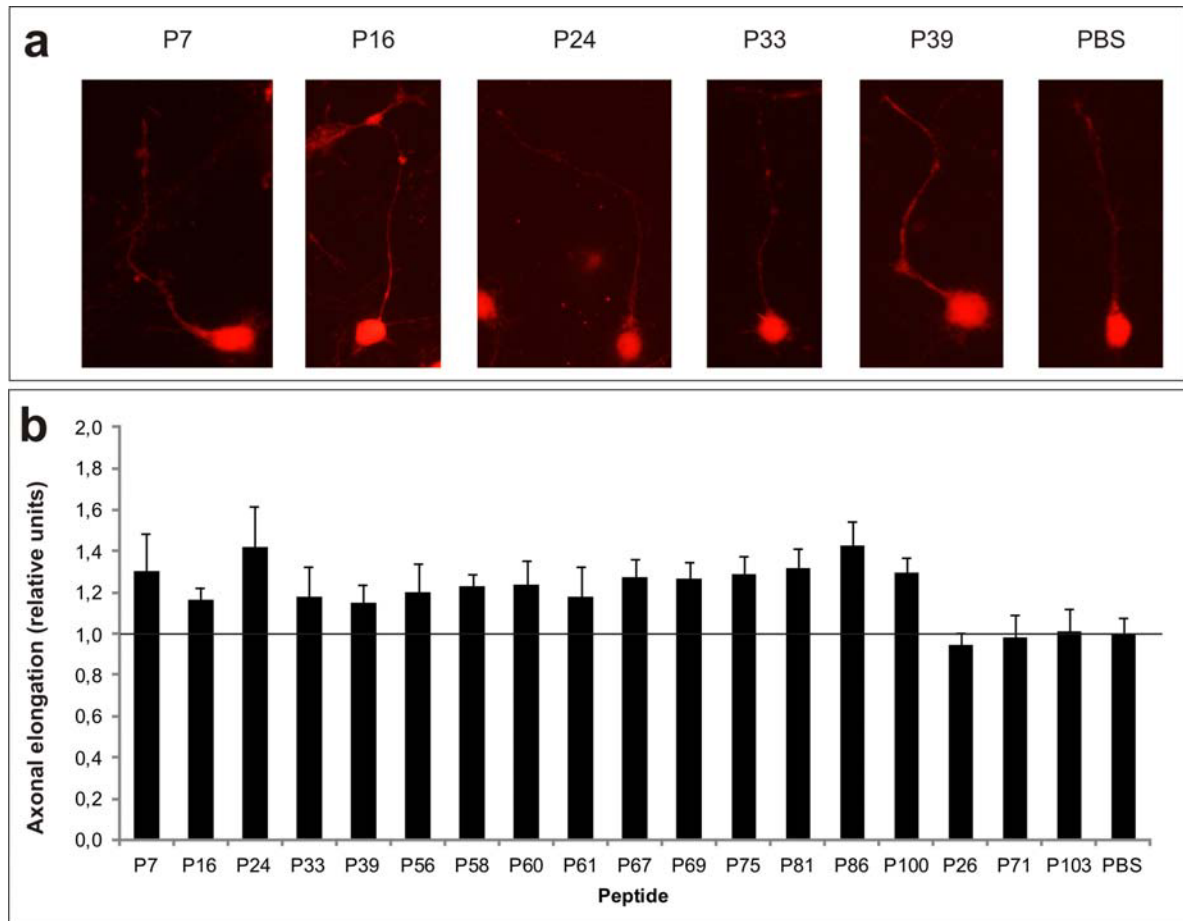


Figure 2. Analysis of the axonal elongation after peptide treatment. Cerebellar granule cells from CD1 mice were plated at low density and treated again with either the peptides at 25 μ M, or the vehicle, PBS. (a) Photomicrographs illustrating some phalloidine-positive CGCs axons after 24 hour of peptide treatment at 25 μ M. Representative images of 5 peptides of the whole library are shown. (b) Relative quantification analysis of the elongation performed by a selection of peptides on CGCs axons compared to PBS. PBS was taken as the unit and results are shown as a fold change. An average of 30 CGCs were analysed per condition.

FIGURE 3

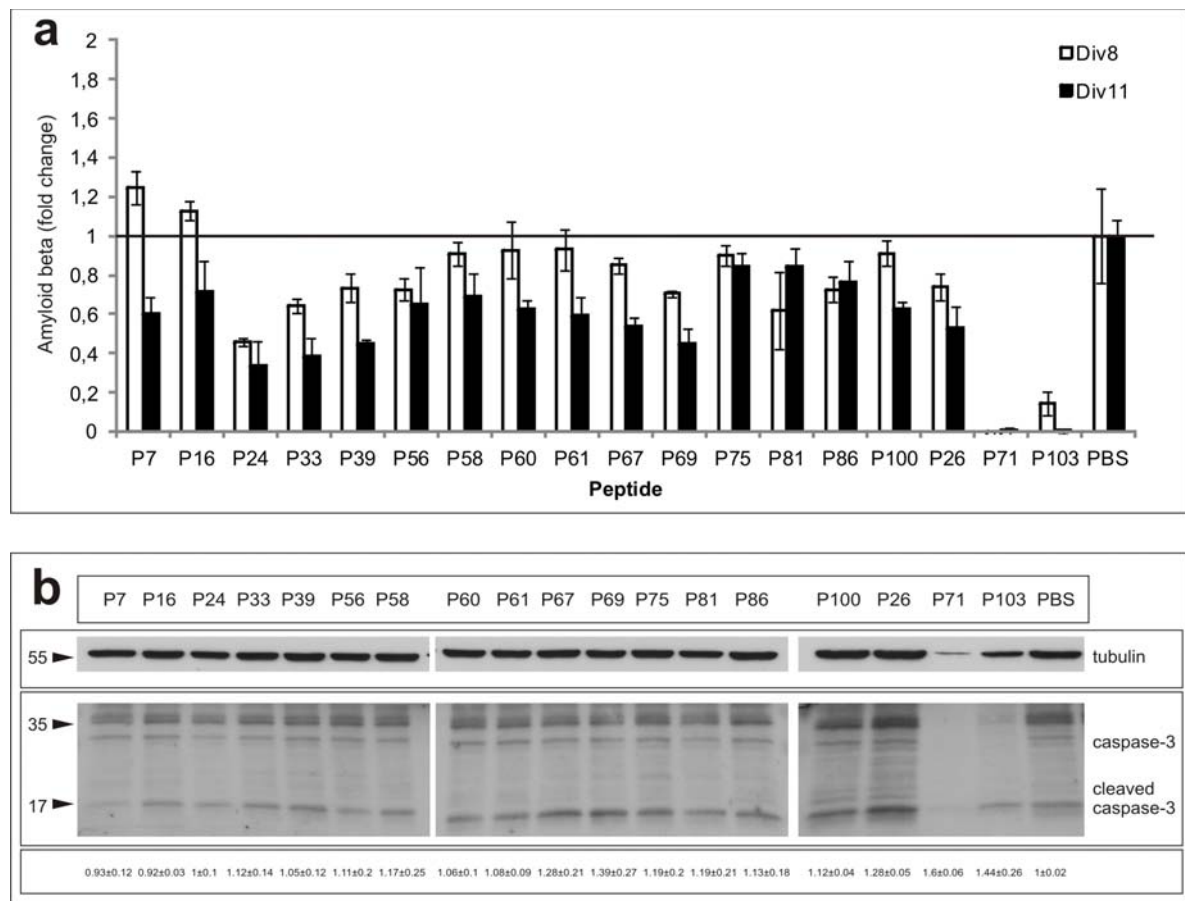


Figure 3. Amyloid-β and caspase-3 levels. Neuronal primary culture from E15-16 CD1 embryos were plated and treated with previously selected peptides (25 μM) or vehicle, PBS, for 48 or 120 hours. (a) ELISA analysis of Aβ 42 peptide levels secreted in the media collected at 8 and 11 days *in vitro*. Some peptides show a reduction of amyloid levels compared to PBS, which was taken as the unit. (b) Western blot analysis of caspase-3 and cleaved caspase 3 levels in the same cultures to test the cytotoxicity caused by peptide treatment. An antibody against tubulin was used for normalization. Peptides 71 and 103 caused excessive cell death, as there is a few amount of protein remaining in the membrane.

FIGURE 4

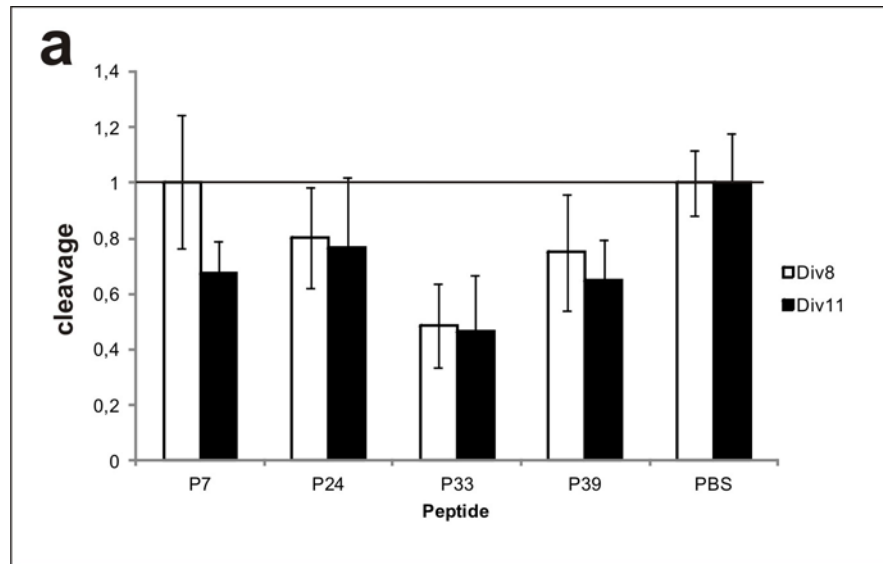


Figure 4. BACE1 activity. Neuronal primary culture from E15-16 CD1 embryos were stimulated with either selected peptides (25 μ M) or PBS. Cells were collected to analyse BACE1 activity using a fluorimetric assay. PBS was taken as the unit and results are shown as the fold change. Significant results were obtained concerning P33 peptide, although P24 and P39 performed well too. Asterisks indicate statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t-test).

FIGURE 5

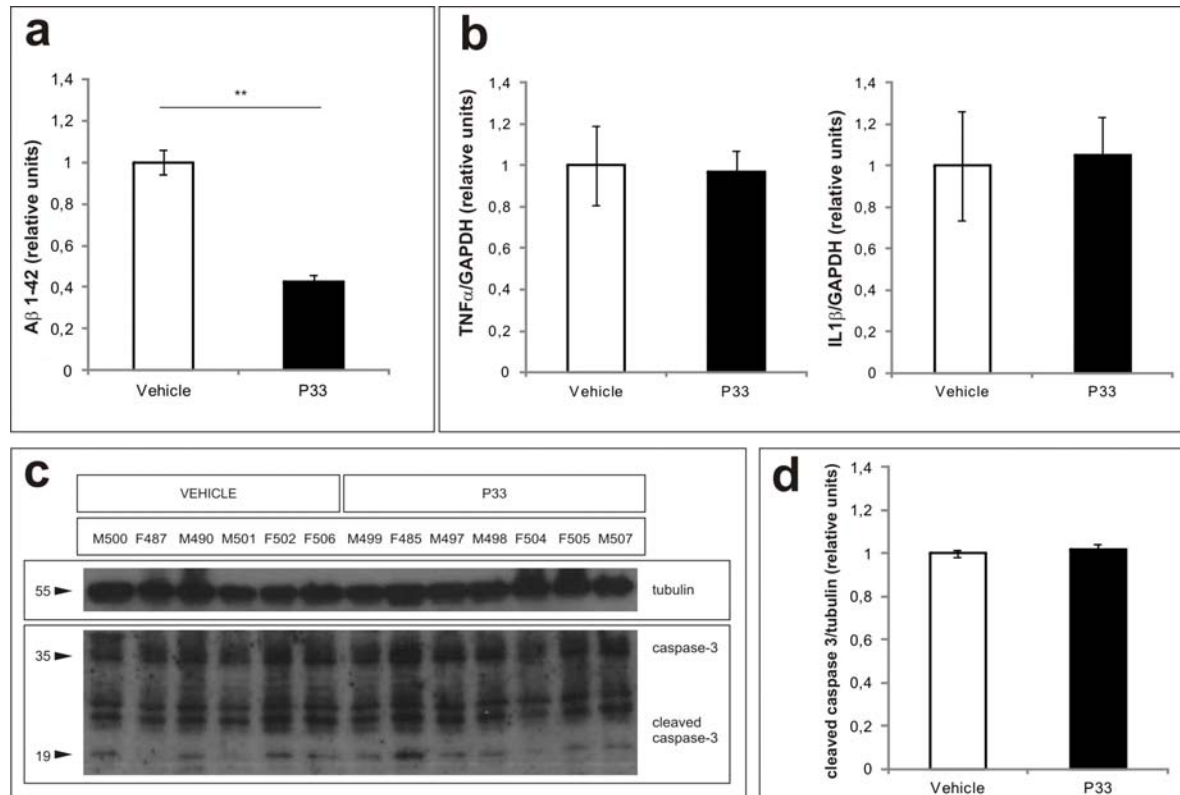


Figure 5. *In vivo* assay performed with P33 peptide in APP/PS1. P33 peptide was injected intraperitoneally at 200 μ g/kg/day in 7 APP/PS1 mice of 6 months together with 6 APP/PS1 animals that were treated with PBS as the vehicle, for 3 days. 6 days after the first administration, their brains were collected and processed. (a) A β 42 levels were analysed by ELISA performed with soluble cortical and hippocampal brain extracts. Results show a significant decrease in the peptide levels in those animals treated with the peptide. (b) Inflammatory response derived from the treatment was analysed by measuring TNF α and IL1 β mRNA levels by RT-qPCR, with RNA extracted from the treated animals. There is no significant result, suggesting no inflammatory response. (c) Caspase-3 and cleaved caspase-3 levels were assessed from soluble brain extracts. Any of the animals showed an activation of caspase-3, suggesting no cytotoxicity was induced because of the treatment. (d) Densitometric analysis of cleaved caspase-3 levels. Asterisks indicate statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t-test).

*RESUMEN DE
RESULTADOS
DISCUSIÓN*

Des de su descubrimiento, la proteína priónica celular (PrP^C) ha estado en el punto de mira de la investigación focalizada en las enfermedades priónicas. Estas enfermedades siguen sin tener cura aunque su prevalencia es muy baja hoy en día. S.B. Prusiner acuñó el término “prión” para referenciarlo al agente causante de estas enfermedades (Prusiner, 1982), un agente de naturaleza proteica, que llevó al descubrimiento de PrP^C. El fenómeno molecular principal en este tipo de enfermedades, es la conversión de PrP^C a su forma patológica rica en hojas beta (PrP^{Sc}) (Colby and Prusiner, 2011), aunque hay datos que sugieren que las dos formas podrían co-existir en un equilibrio dinámico que, en condiciones fisiológicas, favorece a PrP^C (Aguzzi and Calella, 2009). No obstante, existe cierta controversia referente a si esta proteína sufre una pérdida de función o por el contrario, una ganancia de toxicidad en el caso de que ésta sea convertida a la forma patológica.

Muchos han sido los estudios publicados en la última década enfocados en las funciones fisiológicas de PrP^C, así como en su localización celular. Por un lado se han generado modelos *in vivo*, como animales transgénicos *knockout* (KO) (Bueler et al., 1992, Manson et al., 1994), animales que sobreexpresan la proteína (Fischer et al., 1996) o formas truncadas de ésta (Shmerling et al., 1998, Li et al., 2007), e incluso una proteína de fusión PrP^C – GFP (Barmada et al., 2004), que permite una fácil localización. Por otro lado, se han generado también modelos *in vitro*, mediante el uso de líneas celulares transfectadas con la proteína o sus formas truncadas, o con la expresión silenciada de la proteína. Estas aproximaciones nos han permitido indagar en sus funciones y su localización, y conocer el papel de la proteína en procesos como la neuritogénesis, el estrés oxidativo (Brown et al., 2002), la excitabilidad neuronal y la actividad sináptica, pero también en sistemas complejos como el sistema inmune o el sistema nervioso, donde juega un papel importante en el comportamiento y la memoria (revisado en (Linden et al., 2008)).

En nuestro laboratorio, se han realizado análisis genómicos mediante muestras de hipocampo de ratones adultos que sobreexpresan la proteína, que no la expresan, o ratones *wild type* (Rangel et al., 2009), así como en la línea celular de neuroblastoma (N2a) (Llorens et al., 2013b). Los datos obtenidos en estos dos análisis genómicos, validados también por RT-qPCR, han permitido relacionar a PrP^C con un rol en la excitabilidad neuronal, así como en procesos relacionados con el ciclo celular, crecimiento neurítico, tráfico intracelular, entre otros.

Recientemente, el protagonismo de esta proteína ha cobrado fuerza por su implicación en la enfermedad de Alzheimer (EA). Des de las primeras investigaciones de Alois Alzheimer en su laboratorio, no se produjo un gran avance en el conocimiento de esta enfermedad. No fue hasta muchos años después, gracias a técnicas como la microscopia electrónica, que se pudieron contemplar en detalle los componentes neuropatológicos característicos que encontramos en el cerebro de los pacientes. Al inicio de los 90, se formuló la llamada “hipótesis amiloide”, por Hardy y .Higgins (Hardy and Higgins, 1992). Esta hipótesis postula que la pieza central de la enfermedad es el depósito del péptido A β , de modo que la aparición de los ovillos neurofibrilares y demás cambios neuropatológicos, se encuentran corriente abajo en la señalización mediada por estos depósitos.

Existen estadios previos de agregación anteriores a la formación de los depósitos. A β se puede encontrar en su forma monomérica, pero puede ensamblarse formando oligómeros de bajo peso molecular, que se pueden agregar formando oligómeros de elevado peso molecular, estos pueden formar protofibrillas y fibrillas y finalmente se formarían las placas amiloides. A finales de los 90, un estudio ponía en el punto de mira a las formas oligoméricas, mostrándolas como las especies más tóxicas con respecto a formas de mayor complejidad y tamaño como las fibras o las placas

(Lambert et al., 1998), y que mejor correlacionan con la progresión de la enfermedad (McLean et al., 1999, Lesne et al., 2006, Roychaudhuri et al., 2009). Pocos años después, varios autores publicaban protocolos de preparación de oligómeros sintéticos para su uso *in vitro* en el laboratorio (e.g. (Klein, 2002)), facilitando así su estudio, y que han sido utilizados en la presente tesis.

En los últimos años, un volumen considerable de publicaciones ha relacionado a la PrP^C con la EA. Se ha observado que PrP^C podría realizar una posible regulación en el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) por β -secretasa, responsable de su proteólisis en la EA (Parkin et al., 2007, Griffiths et al., 2011). Sin embargo, otras publicaciones han sembrado la controversia en la relación entre la EA y la PrP^C argumentando que esta, debido a su interacción de elevada afinidad con A β , era un posible receptor de las formas oligoméricas (Lauren et al., 2009). Des de esta última publicación, varios han sido los intentos de otros autores por corroborar estos datos, sembrando así la polémica acerca de si la presencia o la ausencia de la proteína están relacionadas con el daño cognitivo presente en la enfermedad, utilizando diferentes aproximaciones, discutidas más adelante en esta discusión.

La publicación de todos estos datos nos hizo preguntarnos qué papel podría tener PrP^C en la fosforilación de tau, si realmente esta es una mediadora de la cascada intracelular de A β , ya que al inicio de la presente tesis, la mayoría de estudios estaban enfocados en el daño cognitivo y el depósito de A β . De este modo, el estudio de la proteína en el transcurso de la enfermedad y la modulación de los niveles de expresión podría ayudarnos a entender qué papel juega en la señalización mediada por A β respecto a tau, así como corroborar los datos publicados acerca del rol de PrP^C en la formación de agregados de A β . Además, la presencia de oligómeros de A β en enfermedades priónicas junto con la descrita interacción entre A β y PrP^C, nos movió a explorar también el papel de los depósitos de A β en la capacidad infectiva de cepas inoculadas de prión.

Debido al gran impacto socioeconómico de la EA, la búsqueda de un tratamiento efectivo ha llevado a ensayos clínicos a multitud de compuestos de diferentes naturalezas. En los últimos años, se han realizado varias aproximaciones, des de tratamientos basados en la inmunoterapia, al uso de péptidos capaces de atravesar membranas biológicas como la BHE para su uso como transportadores de fármacos (Delrieu et al., 2012). El campo de los péptidos capaces de penetrar la membrana presenta una buena alternativa terapéutica, por su capacidad de penetrar diferentes barreras biológicas y actuar frente a dianas intracelulares. Recientemente se ha descrito una familia de este tipo de péptidos llamados γ -péptidos no naturales derivados de prolina (Pujals and Giral, 2008), que pueden ser funcionalizados con tal de conferirles propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas e incluso permiten la unión covalente de un fármaco (Farrera-Sinfreu et al., 2005).

En trabajos anteriores a esta tesis doctoral, se ha demostrado la internalización de estos péptidos en diferentes líneas celulares (Farrera-Sinfreu et al., 2005), y a nivel funcional se ha estudiado su actividad anti-leishmania y anti-malárica (Carbajo, 2012). Más recientemente, también se ha evaluado su capacidad para penetrar la BHE (Pulido, 2014), una propiedad necesaria para un posible uso terapéutico en enfermedades neurodegenerativas.

Teniendo en cuenta los datos explicados en las líneas anteriores, en esta tesis se ha dado respuesta a los objetivos planteados inicialmente, y se han aportado datos que corroboran y amplían los datos bibliográficos iniciales con los que contábamos, ofreciendo información acerca de la modulación ejercida por PrP^C en los niveles de expresión de tau, en pacientes en estadios iniciales de la enfermedad así como en modelos animales, de la relación entre PrP^C y A β tanto en

el depósito de A β como en la infectividad del prión, e incluso se ha abordado el *screening* de una librería de γ -péptidos capaces de penetrar la membrana, con el fin de identificar un *hit* con las características adecuadas de un fármaco, con el componente añadido de poder ser utilizado para la EA. A continuación se discuten los resultados obtenidos y publicados en dos publicaciones y de un tercer artículo en preparación.

1. PrP^C y la fosforilación y expresión de tau

El depósito de la proteína tau en forma de ovillos neurofibrilares es uno de los eventos neuropatológicos característicos de la enfermedad. Debido al creciente interés en la relación entre A β y PrP^C, hemos querido evaluar si la fosforilación de tau y sus niveles de expresión están relacionados con los niveles de expresión de PrP^C en presencia de A β .

Los cultivos que no expresan PrP^C presentan una mayor susceptibilidad a la fosforilación de tau.

El estudio de la influencia de los niveles de expresión de PrP^C sobre la fosforilación de tau se ha realizado mediante cultivos primarios corticales procedentes de la cepa *Zurich I* retrocruzada a un fondo genético C57BL/6, en estadio embrionario 15-16, tratados con ADDLs preparados acorde con el protocolo de Klein 2002 (Klein, 2002). Los resultados obtenidos mediante este modelo se corroboraron utilizando cultivos primarios procedentes de animales *wild type* (WT), en los que se silenció la proteína utilizando un lentivirus expresante de un siRNA- PrP^C. También se ha utilizado la cepa Tg20, que sobreexpresa PrP^C. A nivel *in vivo*, se han generado ratones triples transgénicos APP/PS1 (Jankowsky et al., 2001) con diferentes dosis del gen *Prnp*, cruzando este modelo con la cepa *Zurich I* (Bueler et al., 1992), y la cepa Tg20 (Fischer et al., 1996).

En condiciones fisiológicas, la proteína tau ejerce un papel de estabilización de microtúbulos, participando así en múltiples procesos como el transporte axonal (Terwel et al., 2002). Esta función viene determinada por su nivel de fosforilación, ya que ésta regula su capacidad de unión a microtúbulos e incluso a la membrana celular (Arrasate et al., 2000, Hanger et al., 2009). Ya en la década de los 80, tau se definió como una fosfo-proteína por varios estudios, y puede ser fosforilada en múltiples residuos de serina/treonina y también en tirosinas (ver introducción). A nivel de desarrollo, la fosforilación de tau presenta mayores niveles durante la etapa fetal, de modo que existe menor unión con microtúbulos, lo que les proporciona mayor movilidad. Estos niveles de fosforilación van disminuyendo durante el desarrollo (Hanger et al., 2009). Entonces, la fosforilación de tau es un punto de regulación de su función. También se ha visto un incremento de su fosforilación en taupatías.

Nuestros resultados indican que, en el contexto neuropatológico de la enfermedad, reproducido utilizando el tratamiento con ADDLs, la ausencia de expresión de PrP^C se correlaciona con un aumento de la fosforilación de tau, posterior al tratamiento. En los cultivos procedentes de animales WT obtenidos en la misma camada, no se observa este incremento. Estos resultados contrastan con lo esperado, puesto que PrP^C, presente en las balsas lipídicas, se ha demostrado que está implicada en la activación de fyn en presencia de los oligómeros de A β , fosforilando tau en la tirosina presente en la posición 18 en neuronas WT (Larson et al., 2012). Entonces, esperábamos encontrar un incremento en las neuronas WT. Cabe destacar, que en nuestros experimentos no hemos visto una alteración en este epítipo.

Efectos similares a los que hemos observado nosotros pueden verse en muestras de hipocampo de animales KO recién nacidos con fondo genético FVB, analizadas mediante *microarrays*, mostrando una mayor fosforilación respecto a animales WT (Benvegnu et al., 2011). Como se ha comentado anteriormente, en el desarrollo embrionario y etapas preliminares posteriores de desarrollo, tau se encuentra altamente fosforilada, etapa en que los niveles de PrP^C también son elevados (Tremblay, 2007). Quizás una de las funciones de PrP^C durante este periodo sea la de regular los niveles de tau así como su fosforilación para que los microtúbulos tengan la movilidad que necesitan, mientras que en la etapa adulta probablemente intervendrán otros factores. Resultados similares también se han observado en células HEK293 transfectadas con PrP^C, en las que se producía una disminución de los niveles de tau fosforilada en varios epítomos (ser²⁰² y thr²⁰⁵), en condiciones de estrés oxidativo (Schmitz et al., 2014). Tanto Aβ como tau hiperfosforilada pueden inducir la formación de estrés oxidativo en la célula (Mondragon-Rodriguez et al., 2013), y PrP^C se ha descrito como un antioxidante (Brown et al., 2002), de forma que estos resultados están en concordancia con los nuestros, donde las condiciones de estrés oxidativo serían inducidas por los ADDLs.

Nuestros datos, además, confirman pero también amplían estos resultados a todos los fosfoepítomos estudiados. En nuestros experimentos, la ausencia de *Prnp* incrementa la fosforilación de los epítomos: ser^{396/404} (PHF1), ser²⁰²/thr²⁰⁵ (AT8), y treonina 181, en contraste con los resultados observados en los cultivos primarios originarios de animales *Prnp*^{+/-} o Tg20. En este sentido, se ha visto recientemente que treonina 181 y serina 396 podrían ser sitios de interacción de tau con PrP^C (Schmitz et al., 2014). Entonces, es lógico pensar que estos residuos no estén fosforilados por cinasas intracelulares en los *wild type* o los Tg20 después del tratamiento con ADDLs. Los epítomos mencionados anteriormente se ha descrito que están fosforilados en la enfermedad de Alzheimer (Burack and Halpain, 1996, Gotz et al., 2010), aunque los epítomos reconocidos por los anticuerpos AT8 y PHF1 se encuentran también mayormente fosforilados en cerebros de ratas acabadas de nacer respecto a cerebros adultos (Burack and Halpain, 1996).

En contraste con nuestros datos, otros autores muestran, en cambio, una mayor fosforilación en presencia de PrP^C. Concretamente, se ha observado un incremento de los epítomos asociados a AT8 así como a los reconocidos por los anticuerpos 12E8 (ser^{262/356}) y 9G3 (tyr¹⁸) en neuronas WT después del tratamiento con los oligómeros de Aβ. Otros epítomos como ser^{396/404} correspondientes al anticuerpo PHF1, no se vieron alterados (Zempel et al., 2010). Las diferencias en los resultados podrían ser debidas a diferencias experimentales. En concreto, este estudio se realizó utilizando células de hipocampo de rata a día 18 de gestación, pero en la descripción del protocolo de preparación de los ADDLs, el vial es vorteadado en contraste con otros protocolos de preparación donde precisamente se centrifuga el vial para evitar estimular los cultivos con agregados de mayor tamaño que puedan aparecer en el proceso de oligomerización. Al centrifugar el vial, los oligómeros solubles quedarían en el sobrenadante, y son los que se han utilizado en nuestros experimentos y en la mayoría de los artículos publicados (Walsh and Selkoe, 2004), para tratar los cultivos.

A nivel *in vivo*, la fosforilación de tau ha sido evaluada en animales triples transgénicos, cruzando modelos de EA con ratones que expresan diferentes dosis del gen *Prnp*. Este tipo de aproximaciones presentes en la bibliografía ha mostrado que, en los animales APP/PS1/*Prnp*^{+/-} se observa un aumento en la fosforilación del epítomo tirosina 18 de tau, que correlaciona con una mayor fosforilación de fyn, en comparación con los animales APP/PS1/*Prnp*^{0/0}. Los niveles de fosforilación de fyn, en cambio, son mucho menores en los APP/PS1/*Prnp*^{+/+}. Estos datos sugieren

una relación entre PrP^C y la fosforilación en este epítipo (Larson et al., 2012). Nuestros resultados corroboran esta relación. La generación de los animales triples nos ha permitido ver el efecto *in vivo* de la variación en la dosis de expresión de PrP^C en la fosforilación de tau. Podemos destacar el incremento en el epítipo tirosina 18 en los APP/PS1^{+/+}/Tg20 y en los APP/PS1^{0/0}/Tg20 a los 9 meses de edad, sin cambios en otros epítipos en ningún otro genotipo en las edades estudiadas, mostrando entonces una asociación entre la fosforilación de este epítipo con la sobreexpresión de PrP^C, independiente del genotipo APP/PS1. Cabe destacar que nuestros cultivos procedentes de animales Tg20 presentaban un incremento de expresión de PrP^C después del tratamiento con ADDLs, que desencadenaría un incremento en la fosforilación en tirosina 18. Hay que tener en cuenta que tanto la falta como la sobreexpresión de PrP^C afectarían a su función tal y como refleja una publicación de nuestro grupo, donde los animales KO o sobreexpresantes de PrP^C muestran una elevada susceptibilidad a la excitotoxicidad, relacionada con una elevada muerte neuronal en el hipocampo de estos animales (Rangel et al., 2009).

El epítipo tirosina 18 está implicado en la formación de agregados de tau (Vega et al., 2005). Su fosforilación está asociada a una cinasa de la familia Src, concretamente a la actividad de fyn. Esta proteína se ha localizado en neuronas que también contenían formas fosforiladas de tau en serina y treonina, en cerebros de enfermos de Alzheimer, en los que también se vio una mayor expresión de fyn comparado con controles (Shirazi and Wood, 1993). Se encuentra en neuronas y en el parénquima de pacientes con EA (Lee et al., 2004), en los que se ha visto una alteración de su actividad (Ho et al., 2005), así como en modelos murinos de taupatas y EA (Bhaskar et al., 2010). Algunos estudios indican que fyn actúa de mediadora en el daño cognitivo y sináptico observado en algunos modelos de EA (Chin et al., 2005). También se ha descrito una interacción directa entre PrP^C y fyn (Mattei et al., 2004, Larson et al., 2012)), y se ha observado recientemente la participación del complejo formado por PrP^C y fyn en la fosforilación de tau (Larson et al., 2012). Por otra parte, hay que tener en cuenta que fyn juega también un segundo papel en la enfermedad, puesto que también incrementa el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica (Minami et al., 2012).

PrP^C está ubicada en unos dominios de membrana llamados balsas lipídicas (Mehrpour and Codogno, 2010), y se ha reportado que interacciona con moléculas de adhesión como N-CAM, en neuronas de hipocampo. El resultado de esta interacción resulta en su reclutamiento en las balsas, la activación de fyn, y la inducción de crecimiento neurítico (Santuccione et al., 2005). Estas evidencias junto con nuestros datos, sugieren entonces que un incremento en la expresión de PrP^C correlacionaría con una mayor activación de fyn y la fosforilación de tirosina 18, que aunque como se ha dicho anteriormente, participa en la formación de agregados, hay evidencias que demuestran que la fosforilación en este epítipo no desestabiliza la unión de tau a microtúbulos (Lee et al., 2004). De hecho, se ha demostrado que la región correspondiente a los *octarepeats*, es la zona que interacciona con caveolina-1, proteína presente en las balsas, y mediaría este proceso (Shi et al., 2013, Wang et al., 2013a), y tau ha sido detectada en las balsas lipídicas (Williamson et al., 2008). Otros autores muestran que un anticuerpo anti-PrP, puede inducir una cascada de señalización que resulta en la fosforilación de caveolina-1, que inactivaría fyn, interrumpiendo la señalización (Pantera et al., 2009), contrariamente a los datos mostrados por otros autores, donde el anticuerpo anti-PrP SAF61 induce la activación de fyn y la fosforilación de tau en tirosina 18 (Mouillet-Richard et al., 2000)(Gavin, 2005).

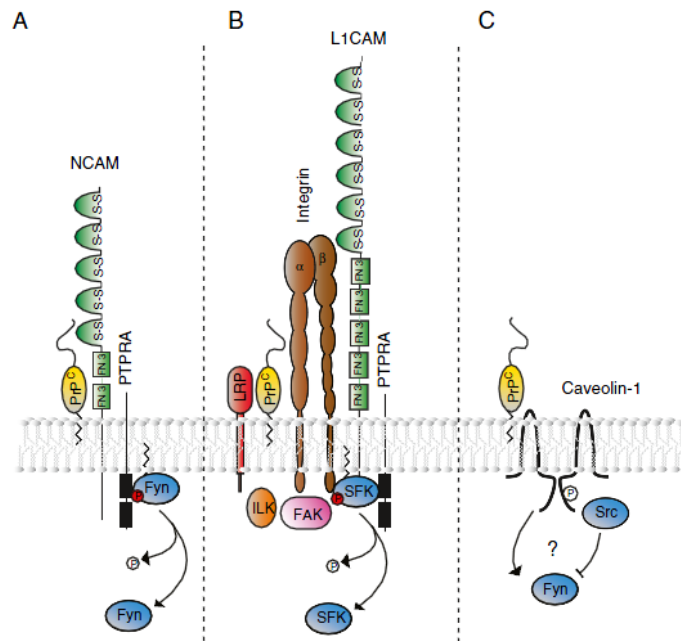


Figura 19. Posibles moléculas receptoras que podrían unirse a PrP^C y participar en la señalización mediada por los oligómeros de Aβ en la enfermedad. Tomado de H Wang 2013.

Respecto a la ausencia de cambios en otros epítomos visto en nuestros animales triples transgénicos, y a su falta de correspondencia con los resultados *in vitro*, puede estar relacionado con el hecho de que los animales se estudiaron en diferentes edades, pero siendo la de 9 meses la más tardía. Los animales APP/ empiezan a mostrar depósitos amiloides a los 4-6 meses de edad, pero las diferencias referentes a los niveles de Aβ₄₂ entre los animales transgénicos y los WT son más evidentes a partir de los 9 meses en adelante (Vergara et al., 2014). Podríamos especular, entonces, que quizás es a partir de esta edad y en edades más tardías, donde los oligómeros de Aβ están suficientemente representados para inducir los cambios vistos *in vitro* en la fosforilación de tau en ausencia de PrP^C, de modo que quizás el análisis de nuestros animales a edades más tardías corroboraría estos resultados. Precisamente es, en las etapas más tardías de la enfermedad, donde los niveles de PrP^C se encuentran muy bajos (McNeill, 2004). Datos referentes a muerte celular o un estudio histológico complementarían estos resultados, puesto que los niveles de PrP^C puedan verse disminuidos debido a la elevada muerte celular presente en la enfermedad, y pueden variar entre los diferentes genotipos.

Recientemente, se ha publicado que la infección por prión está asociada a la activación constitutiva de vía de señalización relacionadas con PrP^C, entre las que se incluye fyn o ERK 1/2. La proteína PrP^{Sc} es capaz de formar oligómeros, de igual forma que el péptido Aβ, y se ha demostrado que PrP^C solo se une a esa conformación (Pradines et al., 2013).

En conjunto, todos estos datos y observaciones podrían sugerir que los agregados tipo oligómeros, podrían interferir en la señalización fisiológica de PrP^C a través de la activación patológica de fyn, induciendo la fosforilación de tau, ocurriendo un mecanismo de pérdida o ganancia de función similar a lo que parece ocurrir en las enfermedades priónicas, pero centrarse únicamente en esta vía de señalización para definir el rol de PrP^C en la fosforilación de tau, puede suponer una simplificación del papel que esta proteína puede tener en la enfermedad (Minami et al., 2012).

La ausencia de PrP^C se correlaciona con un incremento en los niveles totales de tau *in vitro*

En este punto hemos visto, por un lado, que un incremento de PrP^C explicaría el incremento en la fosforilación observado en el epítipo tirosina 18, por su interacción con fyn, pero por otro lado, a nivel *in vitro* los cambios en la fosforilación los hemos observado en ausencia de la proteína y en otros epítipos. Es lógico pensar que el incremento observado en la fosforilación de tau quizás está relacionado con un incremento en los niveles totales de tau.

Los ovillos neurofibrilares característicos de la enfermedad, están principalmente compuestos por la proteína tau hiperfosforilada, y correlacionan con la neurodegeneración en la enfermedad tal i como describieron Braak y Braak (Braak and Braak, 1991). Hay estudios que describen que la sobreexpresión de la proteína tau humana en un modelo de ratón, es suficiente para inducir su fosforilación (Andorfer et al., 2005), y agregación (Spillantini and Goedert, 2013). También se ha descrito que la expresión de una forma truncada de tau reduce la excitotoxicidad mediada por A β (ittner 2010).

Nuestros resultados indican que la dosis de *Prnp* no influye en los niveles totales de la proteína tau en cultivos de neuronas corticales en condiciones fisiológicas, al no haber cambios entre los diferentes genotipos cuando los cultivos están tratados con el vehículo control. Estudios genómicos preliminares realizados mediante *microarrays* en la línea celular N2a (Llorens et al., 2013b), así como en ratones mutantes para PrP^C en estadios más jóvenes en comparación con adultos (Rangel et al., 2009, Benvegnu et al., 2011, Schmitz et al., 2014), corroboran nuestros datos. Pero estas observaciones están parcialmente en contraste con otras publicaciones recientes realizadas con células de neuroblastoma humano (Chen et al., 2013) y células HEK293 (Schmitz et al., 2014), en los que la expresión de PrP^C por transfección en células con unos niveles endógenos bajos, causa una disminución de los niveles de tau. En concordancia con estos datos, datos preliminares de la expresión de tau en animales con diferentes dosis de expresión de PrP^C, tampoco muestran diferencias significativas.

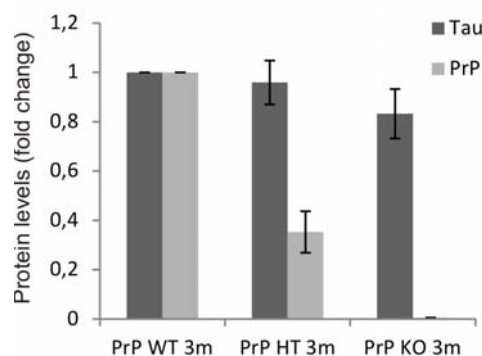


Figura 20. Niveles de proteína de tau y PrP^C en animales con diferentes dosis génicas de PrP^C. Los niveles de tau no muestran diferencias significativas en ninguno de los genotipos analizados a 3 meses de edad.

En correlación con los datos mostrados en el anterior subapartado, el tratamiento con ADDLs en cultivos procedentes de animales KO para PrP^C causa un aumento en los niveles de tau respecto a los mismos cultivos tratados con el vehículo control, y respecto a cultivos procedentes de animales WT. El anticuerpo utilizado es el llamado tau5, que reconoce tanto tau no fosforilada como tau fosforilada, aunque los mismos resultados se han obtenido utilizando un tratamiento previo con λ -

proteína fosfatasa para defosforilar tau y comprobar los niveles totales de proteína de las muestras analizadas. Estos resultados demuestran que el tratamiento con ADDLs en cultivos primarios es capaz de incrementar los niveles de tau en ausencia de expresión de PrP^C. El mismo efecto pudo ser visto en cultivos procedentes del modelo que sobreexpresa PrP^C (Tg20), en los que se vio un aumento de los niveles de tau acompañado por un aumento de la expresión de PrP^C durante el tratamiento con ADDLs. La capacidad de los ADDLs de regular los niveles de tau ha sido publicada recientemente, aunque en células WT de neuroblastoma humano tratadas con oligómeros de A β (Chen et al., 2013).

En nuestro laboratorio pudimos corroborar nuestros datos a partir de cultivos primarios del modelo APP/PS1, con o sin tratar con un lentivirus de silenciamiento de la expresión de PrP^C. En ellos se puede apreciar que la falta de PrP^C causa un incremento significativo en los niveles de tau. A nivel *in vivo*, hemos visto como la ausencia de PrP^C en el modelo APP/PS1 triple transgénico (APP/PS1/Prnp^{0/0}), lleva a un incremento en los niveles de tau en animales de 9 meses de edad, en comparación con el modelo KO para PrP^C, corroborando nuestros resultados *in vitro*. En concordancia con estos datos, se ha publicado que los animales triples APP/PS1/Prnp^{0/0}, muestran una mayor expresión de tau en relación a los Prnp^{0/0} (Larson et al., 2012).

Nuestros resultados indican que PrP^C reduce los efectos de los ADDLs modulando los niveles de tau así como de su fosforilación

¿Cómo regula entonces PrP^C los niveles de tau en presencia de ADDLs? Se ha propuesto que PrP^C regula la transcripción de tau, probablemente a través de la modulación de la vía de fyn, puesto que PrP^C no es desplazado al núcleo, hecho que descarta una regulación directa en la transcripción de tau, sino que se produciría a través de la proteína MEK que se encuentra corriente abajo en la señalización de fyn (Chen et al., 2013). En este mismo estudio no encontraron ninguna alteración en la actividad del proteasoma que indicara que la regulación de tau por PrP^C estuviera relacionada con una mayor degradación de la proteína (Chen et al., 2013).

En contraste con la hipótesis anterior, en nuestro laboratorio hemos visto que al cruzar el modelo APP/PS1 con un modelo de ratón que sobreexpresa tau bajo el promotor de actina, unida a la proteína verde fluorescente GFP, y tras reducir los niveles de PrP^C mediante el uso de un ARN de silenciamiento en cultivos primarios neuronales, se produce un incremento de los niveles de tau, tanto de la endógena, regulada por el promotor de tau, como de la exógena, tau-GFP, regulada por el promotor de beta-actina. Estos resultados indicarían que la ausencia de PrP^C también repercute en otros promotores, o que PrP^C interviene en la modulación de los niveles de tau actuando a nivel de su agregación o de su reciclaje, puesto que no se vieron alteraciones en los niveles de β -actina en las muestras analizadas. Una posible explicación sería la modulación de la degradación de tau por parte de PrP^C, observada en cultivos de neuronas corticales sobreexpresantes de tau, que mostraban una distribución alterada de moléculas de PrP^C intracelulares, que afectaría a su acumulación en la célula, formando agregados insolubles que dañarían el proteasoma (Canu et al., 2011).

El análisis de ovillos neurofibrilares de cerebros pertenecientes a pacientes de Alzheimer ha mostrado que tau no está solamente hiperfosforilada, sino que también está marcada con ubiquitina (Buee et al., 2000), sugiriendo un link entre la hiperfosforilación de tau y el procesamiento mediado por el proteasoma en la acumulación de tau. Probablemente, las células con agregados de tau en su interior, intentarían eliminar estos agregados mediante el marcaje de estos con ubiquitina para ser degradados por el proteasoma. La actividad del proteasoma se ha

visto que está disminuida en cerebros de pacientes con EA (Keller et al., 2000, Keck et al., 2003), aunque su actividad parece disminuir también con la edad (Keller et al., 2002).

El reciclaje o eliminación de proteínas en la célula se puede realizar mediante el sistema del proteasoma o mediante autofagia. El sistema del proteasoma elimina proteínas de vida corta que son marcadas para degradación por ubiquitina, mientras que la autofagia elimina las de larga vida, proteínas estructurales, y las que están dañadas o mal plegadas (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Algunos estudios sugieren que tau no es un sustrato del proteasoma (Brown et al., 2005, Delobel et al., 2005, Feuillette et al., 2005), o al menos que no contribuye a su degradación (Liu et al., 2009), pero otros han visto que su inhibición resulta en la acumulación de tau en las células (David et al., 2002, Liu et al., 2009, Grune et al., 2010) La autofagia también se ha visto que puede degradar tau WT y formas modificadas de la proteína. Otros autores sugieren que la autofagia no parece contribuir a la degradación de tau endógena en neuronas, ya que al activar la autofagia en cultivos primarios corticales de rata mediante rapamicina, no ven una reducción de la cantidad de tau endógena, pero quizás podría estar implicada en la eliminación de tau fosforilada (Rodriguez-Martin et al., 2013). Un aumento en la fosforilación de tau podría también reducir la degradación de tau por el proteasoma, de hecho se ha reportado que la fosforilación de tau resulta en una disminución de la degradación de tau por el proteasoma (Poppek et al., 2006). Una mayor fosforilación de la proteína permitiría una mayor unión de tau al proteasoma, de modo que a mayor cantidad de proteína fosforilada, mayor es la inhibición (Keck et al., 2003).

Otros datos indican que los dos sistemas, proteasoma y autofagia, interactúan. Tau puede ser degradada por ambos (Lee et al., 2013), ya que un sustrato que en condiciones fisiológicas es degradado por el proteasoma, en condiciones patológicas que impliquen un mal funcionamiento de este sistema, puede producirse una compensación por parte de la autofagia. También puede ser posible que según el estado en el que se encuentre el sustrato (fosforilación, agregación, plegamiento) sea degradado por un sistema u otro.

Otros factores que pueden afectar a la acumulación de tau modulando su degradación o su agregación son unas chaperonas llamadas proteínas del shock término, o HSPs (del inglés *heat-shock proteins*). Regulan proteínas que no están plegadas o están mal plegadas para renaturalizarlas o para que sean degradadas (Richter-Landsberg, 2007). Una de las principales familias de chaperonas es la familia de la hsp70, que pueden actuar de forma solitaria o junto con otra chaperona, hsp90, que actúa como homo-dímero (Abisambra et al., 2011), y se ha demostrado la relación de estas proteínas con la degradación de tau (Abisambra et al., 2013, Jinwal et al., 2013).

Todos estos datos sugieren que **en la enfermedad se produce una disminución de la degradación de tau y probablemente una modificación en la síntesis o degradación de ésta.**

Los oligómeros y no las fibras son los responsables del incremento en los niveles de tau en ausencia de PrP^C

La presencia de fibras en el cerebro de enfermos de Alzheimer, formadas por la agregación del péptido A β , es un hecho bien establecido y caracterizado, ya que componen las placas seniles. Varios estudios han demostrado que estas fibras son tóxicas para las neuronas (Busciglio et al., 1992, Busciglio et al., 1995, Geula et al., 1998), y una exposición crónica induce una pérdida sináptica y la presencia de neuritas distróficas (Grace et al., 2002), que también se ha visto *in vivo* en modelos transgénicos (Spires et al., 2005). También se ha publicado una relación entre las

formas fibrilares insolubles y un aumento de la expresión y actividad de BACE1 (Tamagno et al., 2006).

La falta de correlación entre el número y densidad de estas formas fibrilares en forma de placas, y los síntomas clínicos de los pacientes diagnosticados con la enfermedad, puso en entredicho la creencia general de que las placas eran las especies más patológicas del péptido A β , abriendo paso al hecho de que debía existir alguna forma de agregación intermedia que correlacionara mejor con el grado de demencia. Esto originó un gran tema de debate acerca de la participación en la patología de la enfermedad de los diferentes tipos de agregados formados por el péptido A β .

Evidencias recogidas durante las últimas dos décadas parecen sugerir que son las formas solubles y no fibrilares del péptido las encargadas de iniciar la disfunción sináptica y neuronal asociada con la enfermedad (Lambert et al., 1998, Townsend et al., 2006, Shankar et al., 2008). Las especies solubles de A β están presentes en los cerebros de pacientes de Alzheimer y en modelos transgénicos (Gong et al., 2003, Kaye et al., 2003, Lesne et al., 2006, Takahashi et al., 2011), y sus niveles correlacionan mejor que la densidad de placas con el daño cognitivo (Lue 1999, Naslund 2000). Entre estas especies solubles se encuentran los oligómeros, que corresponden a agregados de diferentes tamaños, des de dímeros a dodecámeros e incluso protofibrillas, que comparten propiedades estructurales y funcionales (Deshpande et al., 2006).

Estas observaciones nos han llevado a comprobar la especificidad de los resultados producidos por el tratamiento de los cultivos con ADDLs, y demostrar que estos son debidos a especies solubles y no a agregados fibrilares de mayor tamaño. Para observar las diferencias entre oligómeros y fibras, se ha utilizado un protocolo alternativo al utilizado de rutina en la obtención de oligómeros, para la generación específica de fibras. Las principales diferencias entre los dos protocolos consisten en la temperatura y el pH de la solución en la que está disuelto el péptido: para la generación de oligómeros es necesaria una temperatura de 4°C durante 24h en una solución de pH neutro; en cambio, para la generación de fibras es necesaria una temperatura de 37°C en una solución de pH ácido. Teniendo en cuenta estos datos, se podría pensar que el tratamiento con ADDLs a los cultivos, que se realiza a 37°C, podría desencadenar la formación de fibras en tratamientos prolongados, pero el pH necesario para ello no se corresponde con el pH del medio de cultivo. Para comprobar la eficiencia de los dos métodos en la generación de las respectivas especies, una muestra de oligómeros y una muestra de fibras se han analizado por microscopia electrónica para corroborar la correcta formación de ambas especies en las respectivas muestras. Las imágenes muestran que las condiciones de generación de oligómeros no producen estructuras fibrilares.

El tratamiento de los mismos cultivos mencionados anteriormente tanto con oligómeros como con fibras, nos permitió ver que la variación en los niveles de tau en ausencia de PrP^C es exclusivamente debida a los ADDLs, ya que otros agregados de mayor tamaño como las fibras no inducen este efecto en neuronas. Nuestros resultados aportan un punto positivo más a la visión de que las formas solubles desencadenarían los eventos patológicos que se producen al inicio de la enfermedad.

Dando un paso más en la comprensión del papel de estas formas solubles, el grupo de SE. Lesné ha realizado recientemente un estudio en sujetos sanos de edades comprendidas entre 1 y 96 años, y sujetos con deterioro cognitivo leve, con probable diagnóstico de Alzheimer (Lesne et al., 2013), proponiendo la presencia en la enfermedad de tres "ondas" tóxicas que irían debilitando a las células hasta provocar su muerte, y induciendo los cambios característicos en tau. En la primera de estas ondas, el protagonista sería el A β *56, de estructura dodecamérica, que aparecería a los 40

años; a continuación aparecerían los trímeros; y por último los dímeros, no detectados hasta los 60 años en controles (Lesne et al., 2013). Este tipo de péptido dimérico es el responsable de la fosforilación de tau en el epítipo tirosina 18, quizás mediante la formación de un complejo formado por PrP^C y fyn (Larson et al., 2012), ya que ninguna de las otras dos formas mencionadas era capaz de activar fyn, sugiriendo que la fosforilación en este epítipo podría ser un evento tardío en la enfermedad. El estudio de los diferentes tipos de agregados junto con sus efectos neuropatológicos específicos, ayudará a formar una imagen más concreta de las características de las diferentes fases propias de la enfermedad.

Entonces, podemos concluir que **son los oligómeros y no las formas insolubles o placas, los responsables de los cambios vistos en los niveles de tau y su fosforilación.**

2. PrP^C y la acumulación de A β

La acumulación del péptido A β en placas seniles es una de las características distintivas de la enfermedad. Su número y densidad incrementan con la edad en modelos animales (Johnson-Wood et al., 1997, Kawarabayashi et al., 2001). Se han detectado depósitos amiloides en cerebros de sujetos cognitivamente sanos (Rodrigue et al., 2013), pero también en pacientes de prionopatías (Debatin et al., 2008), sugiriendo una relación entre PrP^C y la acumulación de A β .

El modelo APP/PS1 presenta niveles más elevados de A β respecto al control

En esta tesis se ha utilizado el modelo APP/PS1 como modelo de la enfermedad de Alzheimer. En estos animales, caracterizados previamente a nivel inmunohistoquímico para corroborar la presencia de placas en la corteza y el hipocampo, se ha realizado, en primer lugar, un estudio proteico para analizar la evolución de la producción del péptido amiloide con la edad, de los 3 a los 18 meses, a partir de extractos de corteza e hipocampo. Nuestros resultados muestran diferencias significativas a partir de los 9 meses de edad en los animales transgénicos, que se van amplificando con la edad. Por el contrario, en los animales WT los niveles se mantienen más estables. Esta tendencia se correlaciona en los transgénicos con un mayor depósito en forma de placas tal y como han corroborado otros autores utilizando este mismo modelo (Garcia-Alloza et al., 2006). En otro modelo APP/PS1 similar con la mutación en el gen de la *Presenilina 1* M146L, los animales mostraban una mayor producción del péptido A β ₄₂ correlacionado con la edad (Trinchese et al., 2004). También vemos la misma tendencia en otras cepas (Oakley et al., 2006).

A nivel de la enfermedad, se ha mostrado recientemente, estudiando sujetos de edades comprendidas entre el primer año de vida y los 96 años, cognitivamente intactos, ha mostrado un incremento de algunas especies solubles del péptido A β que correlaciona con la edad, pero la carga amiloide es mayor en los sujetos con Alzheimer probable, respecto a los que presentan un deterioro cognitivo leve o a los que no presentan demencia (Lesne et al., 2013).

Una sobreexpresión de PrP^C correlaciona con una mayor presencia de placas

La proteína precursora amiloide y la proteína priónica celular son proteínas procesadas por la misma familia de metaloproteasas de zinc (Parkin et al., 2007). A nivel patológico, varios estudios han demostrado la participación de PrP^C en la aparición y evolución de las lesiones distintivas de la enfermedad de Alzheimer, como los depósitos de A β , con resultados contradictorios (Schwarze-Eicker et al., 2005, Parkin et al., 2007, Gimbel et al., 2010). Además, PrP^C se ha detectado cerca de depósitos de A β mediante inmunohistoquímica (Ferrer et al., 2001) y acumulada en neuritas

distróficas en cerebros post-mortem de enfermos (Takahashi et al., 2011). Aunque en ratones con depósito amiloide y niveles diferentes de expresión de PrP^C en el cerebro, no mostraron ningún efecto referente a la dosis de PrP^C en la sinaptotoxicidad (Calella et al., 2010) o la memoria (Balducci et al., 2010), mediados por A β .

Con el fin de comprobar cuál es el papel de PrP^C en la acumulación del péptido A β , se ha realizado un estudio complementario al anteriormente mencionado con los animales APP/PS1, variando la dosis de *Prnp*. Siguiendo la evolución de la amiloidosis mediante ELISA, se observó un incremento progresivo en la carga amiloide entre 1 y 9 meses de edad, en los APP/PS1, independientemente de la dosis de *Prnp*. Los niveles más bajos de A β se observaron en los animales APP/PS1/*Prnp*^{0/0}, a los 9 meses, aunque estos no eran significativamente diferentes de los observados en los animales APP/PS1/*Prnp*^{+/+}. Estos datos coinciden con datos presentes en la bibliografía donde tampoco se observan diferencias entre los animales APP/PS1/*Prnp*^{0/0} o heterocigotos para PrP^C en relación a los niveles de A β (Gimbel et al., 2010, Larson et al., 2012).

Los animales con una dosis más elevada de PrP^C, muestran, por el contrario, un incremento significativo en el depósito de A β , indicando una correlación directa dependiente de dosis entre una mayor expresión de PrP^C y una mayor cantidad de A β , que a su vez correlaciona con la presencia de astroglia reactiva, tal y como se ha publicado en otras ocasiones (Velayos et al., 2009). El animal APP/PS1/Tg20 presenta los niveles más altos de placas con A β , corroborando otras publicaciones en los que se ha descrito que la sobreexpresión de PrP^C correlaciona con una mayor formación de depósitos de A β (Schwarze-Eicker et al., 2005). Nuestros resultados también revelan que estos animales exhiben la mayor carga de A β ₄₀ y A β ₄₂, más alta a los 9 meses, sugiriendo una relación entre PrP^C y la carga amiloide dependiente del tiempo. Este hecho correlaciona con el aumento de los niveles de A β con la edad visto en sujetos sanos, sugiriendo que una mayor cantidad de A β estaría relacionada, en parte, con la edad. Una posible explicación a esta observación es que se ha descrito que PrP^C regula el procesamiento de BACE1 sobre APP_{WT}, explicando la falta de diferencias observadas entre los animales KO y los WT de PrP^C. Concretamente, se produce un secuestro de BACE1 en su forma inmadura en el Golgi, donde por el contrario se procesa la proteína APP con la mutación *Swedish* (Griffiths et al., 2011), presente en nuestros animales. Podría ser plausible que la presencia o ausencia de la proteína no tuviera ningún efecto en el procesamiento de APP_{swed}, pero una sobreexpresión de PrP^C causara un aumento de las moléculas de BACE1 en ese compartimento, que tuviera un impacto significativo en los niveles de A β en los ratones que sobreexpresan PrP^C.

Esta hipótesis, pero, no es corroborada por los datos mostrados en las publicaciones donde se observa una correlación entre PrP^C y el depósito amiloide. El estudio de Schwarze-Eicker sugiere que PrP^C participaría en la formación de los depósitos de A β , puesto que los niveles de transcripción de APP o de los péptidos A β ₄₂ y A β ₄₀ no mostraban ningún cambio en los animales en relación a PrP^C (Schwarze-Eicker et al., 2005). Entonces, quizás PrP^C está modulando la agregación de A β o su degradación, ayudando a secuestrar los oligómeros en forma de placas. Por otra parte, el hecho de que tanto la ausencia como la sobreexpresión de PrP^C tengan un efecto en la agregación del péptido A β puede también sugerir una pérdida de función neuroprotectora por parte de PrP^C. Estos resultados, pero, están parcialmente en contraste con otras publicaciones. Otros autores muestran que los niveles de A β no difieren entre los animales KO y WT a los 12 meses de edad, así como tampoco el depósito en forma de placas, pero no muestran datos referentes a la sobreexpresión de PrP^C (Gimbel et al., 2010). Diferencias como la cepa utilizada para cruzar los animales APP/PS1 o la edad a la que se han estudiado los animales, puede inducir

diferencias en los resultados, puesto que la aparición de placas amiloides, presentes en sujetos sanos, aumenta con la edad.

Para corroborar el papel de PrP^C en la agregación de A β , se ha realizado un análisis de la presencia de oligómeros por western blot. Nuestros datos revelan una mayor presencia de oligómeros en los KO respecto a los WT, sugiriendo que PrP^C podría tener un papel protector participando en el proceso de agregación del péptido A β . Estos resultados contrastan con un artículo recientemente publicado, en el que se demuestra que PrP^C es capaz de aglutinar formas oligoméricas de A β y deshacer fibras (Younan et al., 2013). Nieznanski et al, por el contrario, sugiere que un fragmento soluble de PrP^C, probablemente generado durante su proteólisis, inhibe la formación de oligómeros y su toxicidad (Nieznanski et al., 2012), apoyando la hipótesis de un rol neuroprotector de PrP^C.

Nuestros resultados también muestran como el ratio A β ₄₂/A β ₄₀ es superior en los animales KO respecto a los WT o a los que sobreexpresan PrP^C, a los 9 meses de edad, datos que también se han descrito en la enfermedad (Pimplikar, 2009). Estos resultados podrían sugerir una modulación de la actividad de γ -secretasa que por el momento no ha sido descrita, para la formación de un tipo de péptido u otro, puesto que A β ₄₂ es más tóxico debido a su mayor capacidad de agregación (Nunan and Small, 2000), y el hecho de que aumente en los KO podría sugerir una pérdida de esta modulación.

El complejo γ -secretasa produce el péptido AICD durante el procesamiento proteolítico de APP, que actúa como factor de transcripción, una vez translocado al núcleo. Algunos autores han determinado que regula la expresión de p53, la cual a su vez regula la transcripción de PrP^C (Kellett and Hooper, 2009). Esto desencadenaría un *feedback* positivo aumentando la transcripción de PrP^C para inhibir BACE1 y que APP sea procesado por la vía no-amiloidogénica, reduciendo la producción de A β , y por el contrario que se produzca más péptido AICD. Este péptido también se produce en la vía amiloidogénica, pero la unión de los oligómeros a PrP^C podrían afectar a su interacción con BACE1 (Rushworth et al., 2013), así como la disminución de los niveles de PrP^C observada, por ejemplo en el hipocampo (Whitehouse et al., 2010), en el desarrollo de la enfermedad de las formas esporádicas, ya que en las familiares no se ha observado esta reducción. Otra posible explicación podría ser que en los animales que expresan PrP^C, esta participa en la formación de agregados para evitar la presencia de los oligómeros solubles e inhibir así sus efectos tóxicos, función que se iría perdiendo durante el desarrollo de la enfermedad, corroborado por la disminución de los niveles de la proteína observada en pacientes.

El aumento de placas no correlaciona con una mayor expresión de APP o BACE1

La modulación de la expresión de APP o BACE1 puede ser parte del mecanismo subyacente en la acumulación de A β dependiente de PrP^C. En primer lugar, hemos cuantificado los niveles de expresión de APP por western blot en todos los genotipos. Estos no muestran variaciones en ninguno de ellos. Conocer los niveles de expresión por ARN mensajero nos ayudaría a establecer si hay una regulación a nivel de transcripción, aunque estudios mencionados anteriormente no mostraron diferencias (Schwarze-Eicker et al., 2005).

Recientemente se ha relacionado a PrP^C con BACE1 (Parkin et al., 2007, Griffiths et al., 2011), secretasa que participa en la producción del péptido A β (ver introducción). La actividad de BACE1 aumenta con la edad, según han sugerido varios autores (Fukumoto et al., 2002), y está incrementada en formas esporádicas de Alzheimer y correlaciona con un aumento de A β (Fukumoto et al., 2002, Li et al., 2004, Cai et al., 2012). Se han identificado varias proteínas

capaces de regular BACE1 (He et al., 2004), entre las cuales está PrP^C (Kellett and Hooper, 2009, Griffiths et al., 2012), capaz de inhibir BACE1 en cultivos celulares. Además, en estadios avanzados de la enfermedad, los niveles de PrP^C, que se encuentran muy menguados, y correlacionan inversamente con la actividad BACE1 y las placas amiloides (Whitehouse et al., 2013).

A la vista de estos datos publicados, hemos comprobado si el aumento de los niveles de péptido A β observado en los animales que sobreexpresan PrP^C, es debido a una modulación de los niveles de BACE1. Aunque los animales de mayor edad no muestran cambios de expresión de BACE1, pero no podemos descartar una modulación en la actividad de la secretasa.

Nuestro modelo APP/PS1 presenta la mutación *Swedish*, presente en muchos modelos de la enfermedad, que se diferencia de otras en que la proteína APP es preferentemente procesada por BACE1 en la vía amiloidogénica. Este escenario, por el contrario, difiere del que se produce en la mayor parte de casos de Alzheimer, los de tipo esporádico, que no presentan esta mutación. A este hecho hay que sumarle las observaciones publicadas recientemente de la falta de regulación de PrP^C sobre BACE1 en los animales que expresan la proteína APP con la mutación *Swedish* que si se observa en la forma WT.

Estas evidencias indican que, para conocer la posible regulación por parte de PrP^C de la actividad de BACE1, y su relación con el depósito de A β , debería utilizarse un modelo que expresara la forma WT de APP, presente en las formas esporádicas y más comunes de la enfermedad.

La ausencia de cambios en los niveles de APP o BACE1 podría sugerir una posible participación de PrP^C en la agregación o degradación del péptido (Schwarze-Eicker et al., 2005). En pacientes de EA se han descrito modificaciones en la autofagia (Nixon et al., 2005), y en cerebros de pacientes se ha observado que la autofagia está activada (Yu et al., 2005). El tratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTORC1, reduce la cantidad de A β y placas en algunos modelos transgénicos (Jaeger et al., 2010, Spilman et al., 2010), aunque otros estudios no han reproducido estos resultados (Boland et al., 2010), y la ausencia de la proteína beclina 1, necesaria para el inicio del proceso de autofagia, afecta negativamente la autofagia resultando en un incremento en los niveles de A β en un modelo de EA (Pickford et al., 2008). mTORC1 (del inglés *target of rapamycin*), controla la síntesis proteica, y funciona como sensor de nutrientes, energía y redox. También inhibe la autofagia cuando los nutrientes y la energía son abundantes y regula la autofagia a través de mTORC2, que cuando está activado, activa AKT y PKC. AKT a su vez regula mTORC2 estimulando mTORC1 e inhibiendo la autofagia (Spilman et al., 2010). Entonces estudiamos la actividad de mTORC1 de forma directa, cuantificando uno de sus sustratos, S6K, y de forma indirecta, midiendo sus niveles de fosforilación. Ninguna de las dos estrategias mostró diferencias entre los diferentes genotipos. Entonces se determinaron los niveles de autofagia utilizando otra medida, mediante la determinación de los niveles de LC3II, importante para la formación del autofagosoma. Los niveles de LC3II eran mayores en los animales APP/PS1/Tg20 respecto a los APP/PS1/Prnp^{0/0}, sugiriendo que en los animales sobreexpresantes de PrP^C, la autofagia se ha inducido, probablemente debido al aumento en los niveles de A β .

La proteína APP se recicla gracias a procesos de endocitosis y autofagia. Hay artículos que muestran que el péptido amiloide es generado durante el reciclaje de APP, que es rápidamente degradado por los lisosomas (Yu et al., 2004, Yu et al., 2005). Este proceso requiere, en neuronas, su transporte retrógrado al soma neuronal, transporte que en la enfermedad está alterado, resultando en la acumulación de intermediarios del proceso de autofagia (Nixon, 2007), de modo

que los elevados niveles de LC3II podrían indicar una inducción de autofagia que no se ha podido completar, tal y como indicarían los niveles de S6K.

No se sabe si la disfuncionalidad en la autofagia es la base de la acumulación de A β dependiente de PrP^C, o si esto es un efecto secundario que refleja el estrés que genera la carga amiloide. Futuros estudios serán necesarios para determinar si la autofagia está desregulada por un efecto no identificado dependiente de la edad, resultando en un incremento en la generación del péptido amiloide, así como evaluar otros mecanismos posibles que pueden degradar A β , como diferentes enzimas (ver (Wang et al., 2006) para revisión), podría aportar más luz al mecanismo subyacente de acumulación de A β en la enfermedad.

Todos estos datos presentados apuntan a que **existe una relación directa entre la sobreexpresión de PrP^C y el aumento del depósito amiloide**, pero más estudios serán necesarios para determinar si PrP^C podría tener un papel protector en la acumulación del péptido A β inhibiendo BACE1.

3. Papel de A β en la capacidad infectiva del prión

En los últimos años, se han hecho patentes las similitudes que existen entre la proteína precursora amiloide y la proteína priónica celular, siendo ambas capaces de generar especies con tendencia a agregar como el péptido amiloide o PrP^{Sc} respectivamente, ambas involucradas en enfermedades neurodegenerativas, el Alzheimer y las enfermedades priónicas, respectivamente (Checler and Vincent, 2002). Estos dos tipos de patologías comparten características neuropatológicas ya comentadas en la introducción. Ambas proteínas agregan formando formas oligoméricas, que se cree son las más tóxicas, y recientemente se le ha atribuido a la proteína amiloide un comportamiento similar a PrP^{Sc}, es decir “tipo prión” (Calella et al., 2010, Morales et al., 2012).

Debido a que recientemente: i) se ha descrito una interacción directa entre A β y PrP^C (Lauren et al., 2009, Balducci et al., 2010), sugiriendo una relación potencial entre la EA y las enfermedades priónicas; ii) se ha atribuido un comportamiento tipo prión a la proteína amiloide; y iii) se ha observado la presencia de placas amiloides en cerebros de pacientes con prionopatías como GSS o ECJ, probablemente relacionado con una disminución en la actividad de la metaloproteínasa MMP-9, que cataliza la degradación del péptido A β (Pradines et al., 2013), de modo que una disminución de su actividad resulta en un incremento en los niveles del péptido; hemos querido saber si estos depósitos amiloides tienen algún efecto en la capacidad infectiva del prión. Para ello se han inoculado animales de 6 a 8 semanas con 2 cepas de prión: la 22L, y la BSE (del inglés *bovine spongiform encephalopathy*) adaptada a ratón.

PrP^C no afecta a la supervivencia del modelo APP/PS1

Inicialmente se ha analizado la supervivencia de todos los animales transgénicos desde de 1 a 9 meses de edad, para determinar si la presencia o ausencia de PrP^C ejerce algún efecto en la esperanza de vida de los ratones. Nuestros resultados muestran diferencias relacionadas con el genotipo APP/PS1, observándose una mayor supervivencia en los animales APP/PS1^{0/0} con independencia del genotipo relacionado con PrP^C, aunque el número total de animales fallecidos no es muy elevado.

El modelo APP/PS1 presenta una muerte más o menos temprana, y se han observado ataques epilépticos tanto en pacientes de EA como en modelos animales, que podrían ser responsables de esta menor supervivencia en los animales (Palop et al., 2007, Minkeviciene et al., 2009). La

prevalencia de episodios epilépticos en los pacientes de Alzheimer es significativamente mayor respecto a controles de la misma edad (Amatniek et al., 2006). En esta línea, varios autores han observado una mayor supervivencia en los animales APP/PS1 que no expresan PrP^C, a los 9 meses de edad (Gimbel et al., 2010), asociada con la ausencia de ataques epilépticos, presentes únicamente en el modelo APP/PS1/PrP^{+/+} (Um et al., 2012). Estos resultados contrastan con otros en los que se ha observado una mayor susceptibilidad a kainato, agente inductor de excitotoxicidad y ataques epilépticos, en animales KO para PrP^C, sugiriendo una protección por parte de esta frente a los ataques epilépticos (Rangel et al., 2007). Estas observaciones junto con nuestros datos, indican una función protectora de PrP^C.

El depósito amiloide no afecta a la toxicidad inducida por los priones

A continuación, para determinar si el genotipo APP/PS1, y por tanto el depósito amiloide, tiene algún efecto en el desarrollo de las enfermedades priónicas, se han inoculado los animales triples transgénicos con dos cepas priónicas mencionadas anteriormente. Hay autores que han postulado que, como la infección por prión incrementa los niveles de A β , el depósito de A β incrementaría los efectos tóxicos inducidos por la infección por prión (Pradines et al., 2013). Aunque hay evidencias de algunas diferencias en la supervivencia después de la infección por prion en el modelo Tg2576 (Baier et al., 2008, Morales et al., 2010), en nuestro caso no hemos visto mayores diferencias en los ratones con 2 o más copias de *Prnp*, en relación al depósito amiloide, viéndose entonces que la infectividad del prión solo se correlaciona con la presencia o ausencia de PrP^C. Además, como se esperaba, una mayor expresión de PrP^C disminuye la supervivencia significativamente.

Es relevante destacar, que sí hemos observado diferencias en los heterocigotos para PrP^C, respecto a la presencia o ausencia del genotipo APP/PS1, viéndose una menor supervivencia en los heterocigotos con genotipo APP/PS1, que correlacionaría con los estudios anteriores (Baier et al., 2008, Morales et al., 2010). Hay datos que sugieren que PrP^C tiene un papel neuroprotector en la EA regulando los niveles de A β , su depósito o su degradación así como los niveles de tau, de modo que una menor expresión de PrP^C podría repercutir en esta función protectora en el contexto de una infección priónica. Un análisis comparativo de los niveles del péptido A β , el número y densidad de placas, así como los niveles de expresión de PrP^C entre ambos modelos podría aportar luz a las discrepancias entre los resultados. Otro factor a tener en cuenta es la edad a la que se inoculan los animales. En la publicación de Baier et al., se inocula ratones a muy temprana edad y a edad muy avanzada, viendo diferencias en ambos casos pero que son más acentuadas en los animales de mayor edad. En nuestro caso la inoculación se ha realizado a muy temprana edad, aunque con otro modelo que desarrolla las placas meses antes. Sería interesante, entonces, corroborar los resultados a una edad más tardía, donde los depósitos son más evidentes.

También es destacable que en la publicación de Baier se utiliza una cepa priónica diferente. La heterogeneidad en las cepas de prión se debe a las diferencias que estas presentan en cuanto al tiempo de incubación, los signos clínicos, y el depósito de PrP^{Sc}, de modo que cada cepa presenta una conformación de PrP^{Sc} que se propaga, pudiendo diferir en su conformación, asociación con ligandos, entre otros (revisado en (Ermonval et al., 2003)). Además, el patrón de glicosilación depende de la célula huésped. Existen estudios comparativos de diferentes cepas de prión, que se diferencian precisamente en que producen diferentes tiempos de incubación y patrones diferentes de depósitos, y también están relacionadas con diferentes conformaciones de PrP^{Sc} (Safar et al., 1998). Esta variedad presente en las cepas priónicas, así como el uso de diferentes

modelos animales, en el caso de Baier et al., utilizan el modelo tg2576 (Baier et al., 2008), puede estar relacionado con las discrepancias entre los diferentes artículos.

Nuestros resultados sugieren que **el depósito de A β no interviene en la infectividad del prión.**

4. Expresión de PrP^C en diferentes estadios de la EA y en el modelo APP/PS1

Como se ha ido mostrando a lo largo de esta tesis, y en las publicaciones que han aparecido en la última década, existen claras evidencias de que PrP^C tiene un papel relevante en la enfermedad de Alzheimer, y jugaría un papel importante en las cascadas de señalización desencadenadas por A β . Entonces, el estudio de su expresión a lo largo de la enfermedad puede proporcionar más información acerca de su participación.

Los niveles de PrP^C aumentan al inicio de la enfermedad y van disminuyendo progresivamente

En un ratón adulto, los niveles de expresión de PrP^C se muestran prácticamente invariables. En cambio, durante el desarrollo del SNC, parece que existe una regulación de sus niveles, aumentando a medida que éste avanza, incrementando desde la edad embrionaria (E7.5) hasta la postnatal, (Tremblay et al., 2007, Benvegnu et al., 2011), y una vez completado el proceso sinaptogénico, se mantiene estable en un *plateau* durante la vida adulta (Agostini et al., 2013), mostrando, en algunos casos, una mayor presencia de la banda monoglicosilada (25 kDa), dependiendo del anticuerpo utilizado (Goh et al., 2007).

Varios autores han mostrado que en relación al envejecimiento en ratones, los niveles de PrP^C suben en zonas afectadas en la enfermedad de Alzheimer, como la corteza y el hipocampo, mostrando un pico sobre los 9-11 meses de edad (Cuadrado-Tejedor et al., 2011, Agostini et al., 2013). Posteriormente estos estudios muestran una bajada de los niveles a los 13 meses de edad (Cuadrado-Tejedor et al., 2011), y a los 23 meses (Agostini et al., 2013), mostrando entonces una disminución de los niveles durante el envejecimiento. Estos resultados contrastan con los datos observados por otros autores, donde los niveles de PrP^C aumentan en ratones de 17 meses de edad (Velayos et al., 2009), aunque sorprende el hecho de que las muestras fueron cedidas por el grupo de Cuadrado et al., sugiriendo que diferencias en los procesamientos de las muestras, pueden originar discrepancias en los resultados. También se ha mostrado la expresión de la proteína durante el envejecimiento en humanos. El estudio de Whitehouse et al., se realizó en una serie de muestras procedentes de sujetos sanos desde los 20 a los 88 años, y vieron una disminución en la expresión de PrP^C en el hipocampo y en el lóbulo temporal, que correlacionaba con el envejecimiento (Whitehouse et al., 2010).

El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más elevados de la enfermedad de Alzheimer. La disminución de los niveles de PrP^C observados en los animales y en los humanos, podría estar relacionado con la aparición y evolución de la enfermedad, reforzando la hipótesis de un posible papel relevante en la EA. En esta línea se ha realizado un seguimiento de los niveles de la proteína en el modelo de Alzheimer APP/PS1, detallado en la introducción, a diferentes edades: 3, 6, y 9 meses. Los niveles de proteína se han estudiado en extractos proteicos de corteza e hipocampo por western blot, mostrando un incremento significativo a los 3 meses y una posterior bajada que es significativa a los 9 meses de edad, respecto a controles WT. Estos resultados se han

corroborado por RT-qPCR, viéndose el mismo incremento a los 3 meses, junto con un posterior descenso. Resultados similares se obtuvieron a partir de muestras de tejido fijado analizados por inmunohistoquímica.

Nuestras observaciones contrastan con otros datos publicados, como los de Ostapchenko et al (Ostapchenko et al., 2013). Sus datos no muestran diferencias significativas en los niveles de mRNA en el hipocampo o en la corteza, en animales APP/PS1 respecto a animales WT, en ninguna de las 2 edades estudiadas, 6 y 9 meses (Ostapchenko et al., 2013). No hay datos referentes a los 3 meses de edad, y nuestros resultados indican que las diferencias entre los 6 y 9 meses, en los APP/PS1, no son muy elevadas. En cambio, a nivel de proteína, Ostapchenko et al., muestran que los animales APP/PS1 presentan unos niveles de PrP^C mayores a los 9 meses en la corteza respecto al control (Ostapchenko et al., 2013), en contraste con nuestros resultados. En la enfermedad de Alzheimer, la proteína PrP^C se acumula en neuritas distróficas (Takahashi et al., 2011), explicando la ausencia de diferencias en los niveles de mRNA y el aumento de los niveles de proteína, que probablemente corresponde a su acumulación en estas neuritas distróficas. Diferencias en el procesamiento de las muestras y el uso de diferentes anticuerpos o *primers*, junto con el uso de diferentes genes *housekeeping* como control de la RT-qPCR, podrían explicar las discrepancias observadas en los niveles de proteína entre ambos estudios. La disminución de la expresión de PrP^C correlaciona en cambio con unos niveles bajos de PrP^C en el LCR (Meyne et al., 2009).

El estudio de la enfermedad en modelos animales puede tener limitaciones por el hecho de que se desarrollan mediante el uso de mutaciones existentes en las formas familiares. Por ello, es necesario conocer la evolución de los niveles de PrP^C en muestras humanas. Nuestros datos indican que, en muestras post-mortem de hipocampo de pacientes de EA, des del estadio I al VI, hay un incremento de PrP^C en el cerebro en estadios iniciales (I-III), presentando un pico en el estadio III en el caso de los pacientes, que correspondería al pico visto a los 3 meses en el caso del modelo animal. Posteriormente, los niveles de PrP^C disminuyen, siguiendo la evolución de los síntomas. Estos resultados correlacionan con los datos de Griffiths et al y los de Velayos et al. que muestran una menor presencia de PrP^C observada en pacientes de Alzheimer respecto a controles en tres zonas afectadas por la enfermedad como son la corteza frontal, la corteza temporal y el hipocampo (Velayos et al., 2009, Griffiths et al., 2012).

Existen varias publicaciones en los que se ha hecho un seguimiento de los niveles de la proteína durante el desarrollo de la enfermedad, mostrando discrepancias entre ellas. Un ejemplo de estas publicaciones muestra como en muestras obtenidas a los 2 primeros años después del diagnóstico, los niveles de PrP^C son más elevados en comparación con sujetos sanos. En cambio, en muestras analizadas con un mayor tiempo de desarrollo de la enfermedad, se puede apreciar que los niveles son menores cuanto mayor es el lapso de tiempo des del diagnóstico a la obtención de la muestra, comparado con los niveles de un adulto sano (McNeill, 2004). Estos datos contrastan con otros datos dónde únicamente se observa una disminución de los niveles de PrP^C en el lóbulo temporal de los pacientes (Saijo et al., 2011).

Es importante diferenciar entre formas esporádicas o familiares. Estudios como el de Whitehouse et al., donde miran la expresión de la proteína en el hipocampo y la corteza frontal, de formas esporádicas, familiares y controles, muestran una menor expresión de PrP^C en el hipocampo de las muestras esporádicas que no se observa en las familiares (Whitehouse et al., 2010), característica también observada en el artículo de Griffiths et al. (Griffiths et al., 2012), mientras que en el lóbulo temporal no observan esta disminución. Esta diferencia entre las dos formas de la enfermedad,

explicaría las discrepancias observadas respecto al estudio de Saijo et al., donde no se indican si los casos son esporádicos o familiares.

Otros autores han comprobado los niveles de PrP^C a lo largo de la enfermedad mediante técnicas de análisis de expresión por ARN mensajero, viéndose un aumento en los estadios iniciales de la enfermedad (Beyer et al., 2012), corroborando nuestros resultados, seguido de una disminución a partir del estadio III (Llorens et al., 2013a). Muchos estudios están centrados en estadios avanzados de la enfermedad, (estadios III a VI), en los que la creciente muerte neuronal afecta a los niveles de PrP^C (McNeill, 2004). Los estadios iniciales son los más importantes para permitir un diagnóstico previo a los síntomas y así tener más probabilidades de frenar la enfermedad, mediante un tratamiento adecuado.

La evolución de los niveles de PrP^C en la evolución de la enfermedad refleja, entonces, un mecanismo primario de la enfermedad en las formas esporádicas, y no una consecuencia secundaria asociada a los cambios patológicos. La reducción de PrP^C en el cerebro durante el proceso normal de envejecimiento (Whitehouse et al., 2010), sugiere que estas disminuciones en los niveles de la proteína podrían participar en el aumento de la incidencia de la enfermedad en el colectivo de mayor edad. PrP^C se ha descrito que interacciona con BACE1 (Parkin et al., 2007), inhibiendo su actividad, con la consecuente reducción de los niveles de A β , pero si los niveles de PrP^C disminuyen, la actividad de BACE1 aumenta, como se ha visto que ocurre durante envejecimiento y en pacientes con aparición tardía de la enfermedad (Hooper et al., 2008a), es decir las formas esporádicas (Whitehouse et al., 2013), aumentando entonces los niveles y el depósito de A β (ver apartado 2 de la discusión), sugiriendo una función protectora de PrP^C durante la enfermedad. Hay que tener en cuenta que la proteína A β de ratón no agrega (Hooper et al., 2008a), por eso los modelos se realizan con la proteína humana, explicando entonces porqué los modelos KO para PrP^C no muestran ningún síntoma relacionado con la EA.

PrP^C modula los niveles de tau al inicio de la enfermedad

Nuestros experimentos *in vitro* sugieren un mecanismo modulador por parte de PrP^C, regulando los niveles de tau. Entonces es lógico analizar *in vivo*, si existe una correlación entre los niveles de ambas proteínas que refuerce esta hipótesis de papel modulador de PrP^C. Por un lado, se han analizado las muestras procedentes de corteza e hipocampo del modelo animal, mostrando un incremento de tau a los 3 meses, seguido de una disminución de los niveles de proteína a los 6 meses, aunque estos vuelven a aumentar a los 9 meses. El incremento visualizado a los 3 meses se ha corroborado por RT-qPCR, seguido de la misma bajada de expresión visualizada a los 6 meses a nivel de proteína, y son mostrar cambios significativos a los 9 meses. Por otro lado, el análisis de las muestras humanas de hipocampo revela un incremento de tau a nivel de proteína muy al inicio de la enfermedad que va disminuyendo, hasta mostrar una pequeña subida en los estadios finales.

Si tenemos en cuenta que la disminución en los niveles de proteína de PrP^C incrementaría la expresión de tau, que contribuiría a la patología de la enfermedad, y que el incremento de los niveles de proteína de tau pueden participar en su hiperfosforilación, es lógico pensar que un aumento en la expresión de PrP^C en la enfermedad, visto tanto en ratones como en pacientes, podría formar parte de un mecanismo protector, modulando tau. Además, la agregación de A β en forma de oligómeros aumentaría el estrés oxidativo en la célula y PrP^C también ha sido descrito en la literatura como un agente antioxidante (Brown et al., 2002, Schmitz et al., 2014), corroborando la hipótesis de su papel protector.

En conjunto, los resultados anteriores referentes a una posible modulación de los niveles de tau por parte de PrP^C, junto con estos resultados referentes a la expresión de PrP^C durante la enfermedad, sugieren que el control de la expresión de tau por PrP^C, bajo los efectos de los ADDLs, disminuiría a lo largo del desarrollo de la enfermedad o con la edad en el modelo animal, produciéndose entonces un incremento en la fosforilación de tau que llevaría a la aparición de los ovillos neurofibrilares, debido a que la expresión de PrP^C va disminuyendo paulatinamente. Esta disminución correlaciona con un incremento en la aparición de ovillos en cerebros de pacientes de Alzheimer.

Nuestros resultados, junto con los datos publicados hasta la fecha, muestran que **los niveles de PrP^C disminuyen durante el envejecimiento, pudiendo estar relacionado con un mayor riesgo de aparición de la enfermedad, por la modulación que realiza PrP^C sobre BACE1, regulando la homeostasis de Aβ. Además, PrP^C podría formar parte de un mecanismo neuroprotector modulando los niveles de tau al inicio de la enfermedad.**

5. Papel de PrP^C en la transmisión sináptica

Se ha demostrado que PrP^C juega un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso. Participa en procesos como la proliferación de precursores neurales (Steele 2006), o la formación de neuritas en un proceso llamado neuritogénesis (Chen et al., 2003, Santucci et al., 2005). En etapas posteriores, participa en otras funciones como el mantenimiento de la sinapsis neuronal (Brown, 2001).

Estudios enfocados en investigar los efectos de PrP^C sobre la transmisión sináptica han dado lugar a resultados controvertidos. Alteraciones en la plasticidad sináptica se han observado en animales KO para PrP^C, tanto de la cepa *Zurich 1*, como de la cepa con fondo genético 129Ola, y en el modelo de sobreexpresión tg20 (Curtis et al., 2003, Rangel et al., 2009), y el estudio del papel de PrP^C en la toxicidad sináptica mediada por los oligómeros de Aβ ha dado lugar a resultados contradictorios. Los estudios de Calella et al., y Balducci et al., probaron que tanto la ausencia como la expresión de PrP^C no tenía ningún efecto en la disfunción de la plasticidad sináptica del hipocampo en animales APP/PS1 (Calella et al., 2010), o en animales c57 WT con previa inyección de oligómeros de Aβ (Balducci et al., 2010). Estas observaciones contrastan con los datos obtenidos por otros autores (Lauren et al., 2009, Gimbel et al., 2010).

El análisis de la proteína mediante técnicas de microscopía electrónica e inmunohistoquímica, han permitido determinar la ubicación de PrP^C en neuronas, localizándola preferentemente en la sinapsis (Fournier, 2008). Previamente hemos visto que una sobreexpresión de PrP^C, causa un aumento en los niveles de Aβ, y está descrito que los oligómeros de Aβ se unen a las neuronas en puntos enriquecidos con la proteína PSD-95 (del inglés *post-synaptic density 95 kDa*), que es capaz de interactuar con PrP^C (Carulla et al., 2011). PrP^C también participa en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis gracias a su interacción con proteínas asociadas como la sinapsina 1b (Spielhaupter and Schatzl, 2001).

Nuestros resultados no muestran ningún efecto significativo en la expresión de las proteínas sinapsina o PSD-95, en ninguno de los genotipos estudiados, tal y como se ha observado en otras publicaciones (Griffiths et al., 2011), aunque se puede apreciar un pequeño aumento de la expresión de PSD-95 en los animales APP/PS1/Prnp^{0/0} respecto a los animales APP/PS1/PrP^{+/+}, que no es significativo. Estos datos contrastan con lo observado en otros estudios, donde se puede ver

como la ausencia de PrP^C permite recuperar la expresión de PSD-95, sugiriendo la participación de la proteína en la pérdida sináptica presente en la enfermedad (Gimbel et al., 2010).

La pérdida de sinapsis es un fenómeno que ocurre en la EA, y que correlaciona con el depósito de A β . Los datos aportados por Gimbel et al., indicarían que PrP^C podría participar en esta pérdida sináptica por el incremento que se puede apreciar en PSD-95 cuando la proteína no se expresa en el modelo de Alzheimer. Nuestros datos contrastan con estas observaciones, apoyando nuestra hipótesis del papel protector de PrP^C en la enfermedad, sugiriendo que **PrP^C no participa en la pérdida sináptica característica de la enfermedad.**

6. PrP^C en la EA y en otras enfermedades neurodegenerativas

Des de su primera descripción en 1906 por Alois Alzheimer, se han realizados grandes progresos en el conocimiento de la enfermedad de Alzheimer. Gracias al avance en las técnicas moleculares, se ha conseguido describir mejor los agregados que la caracterizan y desarrollar terapias paliativas para algunos de sus síntomas. Las primeras terapias aplicadas en casos diagnosticados, se basan en compensar la pérdida de poblaciones neuronales específicas, cuyas funciones están relacionadas con procesos como la memoria. Estas terapias, de características farmacológicas, pero, no pueden ralentizar la enfermedad.

Alternativas a este tipo de tratamientos se encuentran actualmente en ensayos clínicos, en diferentes fases (Hong-Qi et al., 2012). Estas alternativas se basan en la hipótesis formulada en los años 90, por Hardy y Higgs, llamada "hipótesis amiloide" (Hardy, 2009), y están enfocadas entonces en frenar los mecanismos de señalización desencadenados por el péptido amiloide, en su forma agregada. Los resultados presentados hasta la fecha no han sido del todo esperanzadores, ya que muchos de los ensayos clínicos finalizan sin mostrar diferencias cognitivas entre los diferentes grupos, tratados y placebo. Estos resultados ponen en evidencia que la disminución del péptido amiloide no es la estrategia más efectiva para la enfermedad de Alzheimer.

La reciente publicación acerca de la interacción de PrP^C con los oligómeros de A β y su relación con la fosforilación de tau a través de fyn, ha puesto a esta proteína en el punto de mira. Se ha propuesto a PrP^C como un posible receptor de A β y un posible puente entre el depósito A β y la agregación de tau hiperfosforilada. Las publicaciones enfocadas en estudiar el papel de la proteína en la enfermedad han dado lugar a discrepancias, quedando aún por esclarecer si su papel es de tipo neuroprotector o por el contrario actúa de mediadora en los efectos neuropatológicos de A β . Otros autores apuntan a que PrP^C podría tener un papel inhibitorio de la proteólisis de APP llevada a cabo por BACE1, que reforzaría la hipótesis de que esta proteína jugaría un papel neuroprotector, apoyando la idea de que sería una buena diana terapéutica a potenciar en la enfermedad. Otras evidencias, como la reducción de su expresión durante el transcurso de la enfermedad, corroborarían esta teoría, pero el hecho de que se ha observado su acumulación en neuritas distróficas podría apuntar a una posible pérdida de función fisiológica, dificultando entonces su uso como diana.

Los resultados descritos en esta tesis doctoral, apuntan a un papel neuroprotector de PrP^C. Por un lado, inhibiría BACE1 para evitar la producción de A β , y modularía los niveles de tau para evitar su hiperfosforilación. En estadios más avanzados, PrP^C podría participar en la formación de agregados

de mayor tamaño para secuestrar los oligómeros de A β . Otros datos apuntan a una posible pérdida de función, pudiendo participar en algunas cascadas de señalización patológicas debidas a su acumulación en algunas regiones, como la activación de fyn y posterior fosforilación de tau.

Una hipótesis similar se ha establecido en las enfermedades priónicas. En este tipo de enfermedades es necesaria la expresión de PrP^C, y se ha barajado la posibilidad de una pérdida de función de la proteína, así como a una interacción directa entre PrP^C y PrP^{Sc}, como mecanismo patológico. Además, la acumulación de PrP^C en neuritas distróficas presentes en la EA, y la acumulación de A β en las prionopatías, apuntan a mecanismos patológicos comunes. También se ha observado la presencia de depósitos amiloides y ovillos neurofibrilares en pacientes con enfermedad de Parkinson, abriendo la posibilidad de que PrP^C podría ejercer una función similar en diferentes enfermedades.

PrP^C se ha demostrado que es capaz de unirse a proteínas con estructura amiloide ricas en hojas beta de forma específica (Resenberger et al., 2011). Este tipo de agregados son los que se ha demostrado, en enfermedades como la EA, que son los más tóxicos. De hecho, varias enfermedades neurodegenerativas comparten mecanismos de propagación similares (refs patri), especialmente aquellas en las que se produce un mal plegamiento y posterior agregación de una o varias proteínas, que conforman las llamadas enfermedades amiloides. Algunas de estas enfermedades, a parte de las mencionadas anteriormente, son las taupatías, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington, en las que se agregan las proteínas tau, α -sinucleína, y poliglutamina, respectivamente. Estas proteínas podrían utilizar un mecanismo similar al que presentan las partículas priónicas para extenderse entre neuronas, y PrP^C podría actuar de puente en algunas de ellas.

Se ha descrito que PrP^C podría proteger frente los agregados tóxicos de poliglutamina (Lee et al., 2007), y algunos casos de la enfermedad de Huntington son causados por mutaciones en el gen *PRNP*, que también se han relacionado con síntomas similares a los que caracterizan la enfermedad de Parkinson (Yamazaki et al., 1999). Recientemente, Steele et al., han analizado el posible papel de la expresión de PrP^C en varios modelos de enfermedades neurodegenerativas (Steele et al., 2009), y de hecho parece que PrP^C no juega un papel crucial en las enfermedades estudiadas a través de los modelos animales, como el Parkinson, taupatías o Huntington. Tampoco se vieron diferencias en los niveles de ovillos en el cerebro de animales P301L con diferentes dosis de *Prnp*, aunque los niveles de fosforilación no se analizaron (Steele et al., 2009). Los modelos animales pueden aportar datos significativos referentes a las enfermedades que representan, pero pueden no representar los casos mayoritarios en algunas enfermedades como es el caso del Alzheimer. Estudiar el papel que ejerce PrP^C en diferentes enfermedades basadas en la agregación proteica, nos ayudará a valorar mejor el papel de esta proteína como diana terapéutica.

7. Factores que influyen en el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Las estrategias utilizadas para conocer la función de PrP^C se han basado principalmente en el uso de modelos experimentales. Estos consisten tanto en el uso de cultivos celulares a nivel *in vitro*, como en el uso de los ratones modificados genéticamente. A nivel celular, se han realizado estudios en una gran variedad de líneas celulares, como por ejemplo la línea de neuroblastoma de ratón N2a, pero también en cultivos primarios, que han permitido realizar análisis de expresión

mediante plataformas llamadas *microarrays* para un estudio de regulación genómica a gran escala (Llorens et al., 2013b). A nivel de modelos animales, en los años 90, técnicas como la recombinación homóloga y el clonaje de DNA, permitieron la generación de animales transgénicos. Los mayormente utilizados consisten en aquellos a los que se les ha eliminado o inactivado la expresión del gen que codifica para la proteína, o que contienen más copias de este para conocer el efecto de su sobreexpresión. Las primeras cepas desarrolladas fueron las llamadas *Zurich I* (Bueler et al., 1992), y *Edinburgh* (Manson et al., 1994), del tipo KO para la proteína, o la cepa Tg20 (Fischer et al., 1996), para sobreexpresarla.

A pesar de las grandes ventajas que aportan los modelos animales, existen multitud de discrepancias en los resultados derivados de estos, y una falta de reproducibilidad *in vitro* en algunos casos, que sugiere la presencia de otros elementos no directamente relacionados con la presencia o ausencia de la proteína. La reciente publicación del grupo de A, Aguzzi (Nuvolone et al., 2013), sugiere que algunos de los fenotipos atribuidos a PrP^C podrían ser consecuencia de variaciones técnicas en la generación de algunos de los modelos. Esta hipótesis ya fue descartada en un estudio publicado en el año 2010, que describía la presencia de un fragmento del cromosoma 2 del fondo genético 129 en la cepa *Zurich I* (Calella et al., 2010). Esta cepa, de fondo genético mixto C57BL/6-129sv, aunque retrocruzada al fondo C57BL/6 para eliminar el fondo 129, contiene unos genes llamados genes flanqueantes presentes únicamente en el animal KO, que provienen del fondo genético 129, y que podrían interferir en los resultados y dificultar la obtención de conclusiones claras en la función fisiológica de la proteína. Esto es debido a que los retrocruces durante varias generaciones pueden no eliminar estas regiones flanqueantes del gen modificado (Gerlai, 1996). Los autores demostraron que estos genes flanqueantes no afectaban a los resultados presentes en esta publicación pero sí podrían afectar a otras funciones como la autofagia, hasta ahora atribuidas a PrP^C, y que podrían estar desempeñadas por una proteína codificada por un gen que se encuentra en esa región flanqueante (Nuvolone et al., 2013). Además, algunas de las cepas mencionadas a lo largo de esta tesis, se mantienen en un fondo genético mixto, difícil de purificar mediante retrocruzamientos, y que podrían afectar al fenotipo final del animal.

La historia se complica cuando además están implicados otros modelos, como los utilizados en la EA. La publicación de Lauren et al., y la de Kellet et al., que relacionaban a PrP^C con la enfermedad, provocó que en múltiples laboratorios se cruzaran los modelos *knockout* para PrP^C con los modelos de Alzheimer para corroborar el papel de esta proteína en la EA (Kellet, 2009)(Lauren, 2009).

A nivel de esta enfermedad existen múltiples modelos animales. Un gran porcentaje de estos, están basados en mutaciones que caracterizan las formas familiares, y se ha conseguido obtener multitud de modelos que no llegan a reproducir de forma fiable todos los fenotipos presentes en la enfermedad. Las formas familiares componen un pequeño porcentaje del total de casos diagnosticados, y dificulta, en ocasiones, la interpretación de los resultados. Un ejemplo es el caso de la mutación *Swedish*. El grupo de Kellet et al., propuso que PrP^C podría tener un papel neuroprotector en la enfermedad por su posible modulación de la actividad de BACE1, secretasa responsable de la formación del péptido A β . La falta de reproducibilidad de resultados obtenidos *in vitro*, y los obtenidos por otros laboratorios llevó a pensar que PrP^C no participaba en esta modulación, hasta que se demostró, *in vitro*, que PrP^C es capaz de inhibir el procesamiento de APP_{WT}, y no de APP_{swe}, debido a la diferente localización de ambas proteínas (Griffiths et al., 2012). Esto explicaría la ausencia de diferencias entre los animales APP/PS1/Prnp^{0/0} y APP/PS1/PrP^{+/+}

respecto a los niveles o depósito de A β reportado por varios autores (Calella et al., 2010, Gimbel et al., 2010, Larson et al., 2012), pero que si se ha visto en casos de sobreexpresión de PrP^C (Schwarze-Eicker et al., 2005), como hemos visto nosotros.

Este no es el único resultado contradictorio obtenido a nivel del estudio del papel de PrP^C en la enfermedad de Alzheimer. Esto ha provocado que la comunidad científica no haya llegado a un consenso acerca de si tiene un papel neurotóxico o neuroprotector. Por ejemplo, hay grupos independientes que coinciden en que PrP^C no es requerida para la toxicidad sináptica inducida por los oligómeros de A β (Balducci et al., 2010, Calella et al., 2010, Kessels et al., 2010). No obstante, resultados opuestos han sido publicados (Lauren et al., 2009, Gimbel et al., 2010). Todos estos estudios difieren en el modelo utilizado para probar sus hipótesis, ya sea diferente cepa del animal *knockout* para PrP^C, el uso de animales WT inoculados con oligómeros e incluso modelos celulares. El mismo tipo de discrepancias se observan en estudios referentes a la participación de PrP^C en la fosforilación y expresión de tau (Zempel et al., 2010, Um et al., 2012, Chen et al., 2013, Schmitz et al., 2014), especialmente en el epítipo tirosina 18 y su fosforilación por fyn (Larson et al., 2012, Ordonez-Gutierrez et al., 2013). Varios autores afirman que la unión de A β a PrP^C provocaría la activación de fyn en las balsas lipídicas y a su vez esta fosforilaría tau, pero centrarse únicamente en esta vía es una simplificación del extremadamente complejo proceso de regulación de la fosforilación de tau en la enfermedad.

Una posible alternativa para generar nuevos modelos animales es el uso de una técnica novedosa llamada CRISPR (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Hasta el momento, muchos de los animales transgénicos se producen por inserción génica utilizando la recombinación homóloga, en células madre embrionarias. Si además el fondo génico de estas células difiere del fondo del que proviene el blastocisto en el que estas células madre se inyectan, se produce una quimera con genes que pueden interferir en el fenotipo final (Nuvolone et al., 2013). Si además se quiere obtener un modelo con más de una delección, el coste y el tiempo aumenta considerablemente. Esta técnica, permite acelerar el proceso y reducir el coste, permitiendo la modificación de múltiples genes de forma más eficiente (Wang et al., 2013b).

Otro factor importante a tener en cuenta en el estudio de enfermedades neurodegenerativas es la edad. En el caso del estudio de la proteína PrP^C, su papel en el envejecimiento también ha dado lugar a diferencias, probablemente debidas a los diferentes animales utilizados pero también a la falta de consistencia en las edades de estudio (Gasperini and Legname, 2014). Los ratones a partir de 6 meses aproximadamente, empiezan a mostrar cambios relacionados con la edad, que se hacen más patentes a los 10-15 meses (Gasperini and Legname, 2014). En la EA, el envejecimiento es un factor de riesgo, hecho que sugiere, entonces, que la edad de estudio también es un elemento clave a considerar cuando se interpretan los resultados obtenidos, y que podría explicar algunas de las discrepancias publicadas.

En el año 1998, Lambert et al., destacaba los oligómeros de A β como las especies más citotóxicas presentes en la enfermedad (Lambert et al., 1998). Des de entonces se ha producido un aumento considerable en las publicaciones referentes al estudio del papel tóxico de estos oligómeros en la enfermedad. Para ello se han desarrollado diferentes protocolos para su obtención en investigación, partiendo también de diferentes tipos de muestras, des de sintéticas, a biológicas, ya sea procedentes de modelos animales, como de pacientes diagnosticados. Esta disparidad en los protocolos de obtención de los oligómeros también puede jugar un papel relevante en el resultado final del estudio, debido a la heterogeneidad de la población oligomérica.

Podemos concluir, entonces, que los resultados obtenidos dependen en gran medida de la edad y la cepa de los animales, así como de las diferentes condiciones experimentales, como por ejemplo los oligómeros de A β . Idealmente, para eliminar la influencia del fondo genético, el trabajo preferentemente con cepas coisogénicas facilitaría el estudio del papel de PrP^C, tanto fisiológico como en enfermedades neurodegenerativas. Además, en una enfermedad tan compleja como la EA es necesario primero obtener un buen modelo lo más fiable posible a la enfermedad y sobretodo estudiar muchas edades a diferentes tiempos, puesto que sucesos como el estado de fosforilación de tau puede cambiar radicalmente.

8. Caracterización de un γ -péptido derivado de prolina como potencial agente terapéutico

En los últimos años se ha hecho patente la necesidad de encontrar mejoras en el diagnóstico de la EA así como en las terapias utilizadas. Actualmente, el diagnóstico se realiza principalmente en estadios sintomáticos, en los que la enfermedad ya está muy avanzada. Las estrategias terapéuticas utilizadas son de base farmacológica, y están enfocadas en actuar sobre el sistema colinérgico y el glutamatérgico sin frenar su avance. Algunos ejemplos de este tipo de fármacos son Memantina, y Donezepilo (Parsons et al., 2013), que se administran en fases avanzadas de la EA. Alternativas no farmacológicas se han desarrollado basándose en la inmunoterapia, activa o pasiva, así como en el uso de inhibidores o moduladores de los complejos enzimáticos que participan en la producción del péptido A β . En ensayos clínicos, muchas de estas alternativas han demostrado que el número de placas consigue verse reducido, pero sin mostrar mejoras cognitivas respecto al grupo control (revisado en (Farlow and Brosch, 2013)).

Muchas de estas terapias están enfocadas en el péptido amiloide y en la teoría de la “cascada amiloide”, detallada en la introducción de esta tesis. Aunque consiguen disminuir el depósito de A β , no tienen efecto en la patología derivada de la proteína tau hiperfosforilada (Wisniewski and Goni, 2014). De este modo, probablemente una terapia dirigida a las dos patologías sería una buena alternativa, aunque hay que tener en cuenta también que las terapias amiloides actuales se basan en la secuencia original de péptido A β (Wisniewski and Goni, 2014), con un riesgo implícito de una posible reacción cruzada.

En esta tesis se presenta un péptido de la clase de los γ -péptidos, sintetizado a partir del monómero *cis- γ -amino-L-prolina* (Farrera-Sinfreu et al., 2005). Pertenece a la clase de péptidos llamados “péptidos capaces de penetrar la membrana”, denominados en inglés *cell penetrating peptides* (CPPs). Estos CPPs ofrecen ventajas respecto a otros sistemas por su baja toxicidad o elevada eficiencia de entrada en diferentes líneas celulares (Bechara and Sagan, 2013). Debido a su capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica, evaluamos su posible aplicación en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Este péptido procede de una librería formada por 50 péptidos.

Los γ -péptidos derivados de prolina muestran una baja toxicidad e inducción de crecimiento axonal en un modelo neuronal

Inicialmente, se han evaluado los péptidos en relación a su toxicidad. Nuestros resultados muestran como la mayoría de los γ -péptidos testados que conformaban la librería, no inducen citotoxicidad neuronal en el modelo utilizado para definir las condiciones experimentales. El tipo

celular corresponde a cultivos primarios de células granulares del cerebelo (CGCs), que son un buen modelo experimental *in vitro* para el estudio de procesos moleculares y celulares, como procesos de apoptosis o supervivencia neuronal en escenarios como las enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la EA (revisado en (Contestabile, 2002) y (Canu and Calissano, 2003)). Las CGCs también se han utilizado en investigación para examinar el crecimiento neurítico ((Deng et al., 2013)). Otros estudios también han utilizado este modelo para la identificación de nuevos péptidos capaces de penetrar la membrana (CPPs) ((Sheng et al., 2009)). Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos en otros modelos celulares ((Farrera-Sinfreu et al., 2005)).

Una vez demostrada su baja toxicidad, nos hemos centrado en su posible papel como terapia en la enfermedad. Las placas seniles presentes en los cerebros de los pacientes de EA están formadas por un núcleo denso de péptido A β y neuritas distróficas alrededor (Serrano-Pozo et al., 2011). Estas neuritas se caracterizan también por la presencia de ovillos neurofibrilares formados por la proteína tau hiperfosforilada. La acumulación de tau en los axones llevaría a un mal funcionamiento del transporte axonal y finalmente a la pérdida neuronal. El transporte axonal es un proceso muy importante para el mantenimiento de la viabilidad neuronal (Stokin and Goldstein, 2006), y los oligómeros de A β pueden interferir en la función sináptica. Entonces, la regeneración de neuritas que se encuentran en proceso de degeneración, ayudaría a retrasar el daño cognitivo. En esta línea, el mismo modelo celular anteriormente mencionado, fue utilizado para evaluar su capacidad de elongación neurítica. Aproximadamente la mitad de los péptidos mostraban un mayor crecimiento neurítico respecto al control, aunque los resultados eran mejores en 16 casos del total de péptidos.

Los γ -péptidos derivados de prolina disminuyen los niveles de A β regulando la actividad de BACE1

Utilizando las condiciones establecidas previamente de concentración y densidad celular, los péptidos seleccionados fueron testados en otro modelo celular más próximo a la enfermedad: cultivos primarios de neuronas procedentes de la isocorteza y el hipocampo. Las neuronas que se encuentran en estas áreas son las más afectadas en los enfermos de Alzheimer (Braak and Braak, 1995). Utilizando este modelo celular, hemos evaluado la secreción de péptido A β al medio celular post-tratamiento con los péptidos. El depósito amiloide constituye una de las características distintivas de la enfermedad. En modelos animales se han publicado estudios que muestran que este péptido empieza a depositarse en el cerebro en edades muy tempranas, a los 4 meses de edad (García-Alloza et al., 2006), y que los niveles de A β incrementan (Vergara et al., 2014). Entonces, cabría esperar que una reducción en la producción del péptido A β llevara a un menor depósito y por tanto a una mejora en estos animales. Los resultados muestran una disminución de los niveles del péptido A β en algunos de los cultivos tratados con los péptidos, respecto al control tratado con tampón fosfato salino (PBS).

Paralelamente también se ha analizado de toxicidad derivada del tratamiento, mediante la detección de una subunidad de la caspasa 3. Esta proteína, inductora de la apoptosis, requiere ser cortada en dos subunidades de 12 kDa y 17 kDa para su activación, de modo que la detección de estas subunidades es un reflejo de su activación (Namura et al., 1998). Además, una elevada muerte celular podría reflejarse en una disminución en la producción de A β y por tanto en una disminución de los niveles de A β en el cultivo, que podrían estar enmascarando el efecto del péptido. Los resultados de toxicidad nos permiten afirmar que muchos de los péptidos que causan

una disminución en los niveles de A β , esta no es debida a muerte celular que podría estar causada por el tratamiento. La elevada muerte celular causada por

Los mecanismos moleculares que pueden regular los niveles del péptido A β varían desde la proteólisis de su proteína precursora, a una alteración en su degradación. Uno de los puntos de regulación en la producción del péptido A β es BACE1, secretasa encargada de procesar proteolíticamente su proteína precursora APP, permitiendo la formación del péptido en la vía amiloidogénica característica de la enfermedad (Hampel and Shen, 2009). Varios estudios indican que en cerebros de enfermos de EA examinados post-mortem, la actividad de esta secretasa está alterada (Stockley and O'Neill, 2007). También se han publicado datos referentes a un aumento de la actividad BACE1 del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Ewers et al., 2011). Entonces, una disminución de la actividad de BACE1 se vería reflejada en una disminución en la producción de A β , así como en sus niveles.

Entonces, es lógico pensar que los péptidos puedan estar modulando la actividad de esta secretasa. Los experimentos anteriores nos han permitido seleccionar 4 péptidos para el estudio de los niveles de actividad de BACE1 en estos cultivos. Los resultados revelan una disminución de la actividad en todos los péptidos, siendo los cultivos tratados con el péptido P33 los que menor actividad presentan, mostrando una reducción significativa de aproximadamente un 50%. El péptido P33 entraría, entonces, en la categoría de inhibidores o moduladores de BACE1. El reciente descubrimiento que una mutación de APP que inhibe su procesamiento por BACE1 sería protectora frente a la enfermedad, ha impulsado la investigación de inhibidores de BACE1 (Jonsson et al., 2012). Múltiples ensayos clínicos se han llevado a cabo utilizando inhibidores de segunda y tercera generación, puesto que los de primera generación carecían de algunas de las características necesarias para su uso *in vivo*. En estos ensayos se han obtenido buenos resultados en cuanto a la reducción de los niveles de A β en plasma y LCR (Yan and Vassar, 2014), aunque otros se han parado debido a efectos adversos (May et al., 2011).

Los inhibidores de BACE1 van dirigidos al sitio catalítico de la enzima. Eso se traduce en la generación de moléculas con el tamaño suficiente para unirse con una elevada especificidad al sitio activo de la enzima, y a la vez tener las características necesarias para penetrar tanto la barrera hematoencefálica como la celular. Ejemplos de inhibidores de BACE1 son el compuesto MK8931, capaz de reducir la concentración de A β en el LCR de forma sostenida y dependiente de dosis (Forman et al., 2012, Forman et al., 2013), o el LY2886721, mostrando buenos resultados en reducir la concentración de A β cerebral, pero el estudio en fase 2 se suspendió recientemente por algunos casos de problemas en el hígado. En nuestro caso, estudios posteriores nos ayudarán a determinar la naturaleza del mecanismo por el que el péptido P33 disminuye la actividad de BACE1, ya sea de modo directo o indirecto.

Los resultados *in vivo* corroboran los resultados *in vitro*

Los resultados anteriores han sido corroborados *in vivo* en el modelo de Alzheimer APP/PS1. Este modelo expresa la proteína APP humana con la mutación *Swedish* (Lys670Asn, Met671Leu), localizada en el sitio de corte de la β -secretasa, mejorando la eficiencia de esta en el procesamiento proteolítico de APP, aumentando la producción de los péptidos C99 y A β (Griffiths et al., 2011, Vassar, 2014). Para este ensayo se han utilizado 13 animales de 6 meses de edad para inyectar el péptido P33 intraperitonealmente a 7 de los animales, o el vehículo PBS, en los 6 restantes. Se han utilizado tanto machos como hembras. Los animales tratados con el péptido muestran una reducción significativa de los niveles de A β en el cerebro, corroborando los

resultados obtenidos en los cultivos celulares. Estos datos demuestran que el péptido es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y la membrana celular.

El estudio de la actividad de BACE1 en estos animales, ayudará a conocer el mecanismo de acción del péptido. Como ya se ha apuntado en otros apartados de esta discusión, existen diferencias de procesamiento relacionadas con la presencia de mutaciones en la proteína APP. En los cultivos primarios utilizados, se expresa la forma WT de APP, denominada APP_{WT}. En cambio, en el modelo APP/PS1 utilizado se expresa la forma APP_{swe}. Varios artículos han demostrado que proteínas con capacidad de regular la actividad de BACE1, como PrP^C, actúan diferente frente a las dos formas de APP, mostrando esta regulación únicamente en la forma WT (Griffiths et al., 2011). Eso se debe a que la forma WT de APP es cortada normalmente por BACE1 en los endosomas, pero la presencia de PrP^C hace que los niveles de BACE1 en estos orgánulos sean menores, y aumenten en el complejo de vesículas del Golgi, donde normalmente se procesa APP_{swe}, impidiendo entonces el procesamiento de APP_{WT}. Nuestros datos sugerirían entonces, que el péptido puede modular la actividad de BACE1 independientemente de su ubicación, pudiendo ser utilizando tanto en las formas esporádicas como en las formas familiares que tienen la mutación *Swedish*.

Experimentos posteriores ayudarán a conocer las propiedades farmacocinéticas del péptido, y saber su mecanismo de acción, establecer la mejor dosis así como el patrón de administración, para no perjudicar las funciones fisiológicas de BACE1.

BACE1 es una enzima que participa en múltiples procesos (ver introducción). Una inhibición crónica de esta enzima perjudicaría sus funciones fisiológicas, de modo que en este caso la dosis juega un papel muy importante. Además, el efecto de los inhibidores de BACE1 puede verse modificado sustancialmente según si su administración se produce antes del inicio del acúmulo de A β , o cuando este ya está bastante extendido. Actualmente existen iniciativas para probar fármacos en grupos de riesgo de padecer la enfermedad, como homocigotos para el alelo 4 del gen apoE que aportarán datos muy relevantes. Los sujetos que participan en este tipo de estudios, *Amyloid treatment in Asymptomatic Alzheimer's disease trial (A4)* (Yan and Vassar, 2014), son sujetos sanos con un elevado riesgo genético de padecer la enfermedad.

Nuestros datos demuestran que **los péptidos derivados de prolina podrían ser una buena estrategia terapéutica alternativa a las actuales terapias disponibles en la enfermedad, siendo el péptido P33 un potencial modulador de los niveles de A β .**

9. Próximos pasos en el estudio de PrP^C y la EA

Como se ha ido relatando a lo largo de esta discusión, se ha llevado a cabo un gran esfuerzo por determinar el papel de la proteína priónica celular en la enfermedad de Alzheimer. La falta de publicaciones que evaluara su papel en la fosforilación de tau y su expresión en el desarrollo de la enfermedad, hacían patente la necesidad de su estudio al inicio de esta tesis doctoral. Los resultados recogidos en esta tesis suponen un intento de esclarecer el papel de PrP^C en la EA, a diferentes niveles.

Por una parte, hemos descrito que, en cultivos primarios neuronales procedentes de la cepa *Zurich / knockout* para PrP^C, el tratamiento con ADDLs, también conocido como oligómeros de A β , induce un aumento en la expresión de tau y en su fosforilación. El tipo de regulación que PrP^C ejerce sobre tau no sería a nivel de transcripción puesto que en cultivos primarios procedentes de

animales que expresan tau endógena y tau bajo el promotor de actina, también muestran estos cambios. Estos resultados correlacionan con los que hemos observado en el modelo APP/PS1. En este modelo, los niveles de tau aumentan al inicio de la enfermedad, junto con los niveles de PrP^C. Se ha demostrado en pacientes de Alzheimer que los niveles de PrP^C disminuyen a lo largo de la enfermedad, aunque parecen aumentar al inicio. Estos resultados sugieren entonces que PrP^C podría estar regulando los niveles de tau, aunque debido a la disminución de sus niveles durante el desarrollo de la enfermedad, la acumulación de tau podría provocar su hiperfosforilación y su agregación en forma de ovillos. No obstante, no hemos podido corroborar estos resultados *in vivo* en nuestro modelo triple transgénico. Cabe destacar que para realizar este modelo se utilizó la cepa *Edinburgh*, diferente de la que hemos utilizado en los cultivos celulares. Además, en el caso del modelo solo hemos estudiado hasta la edad de 9 meses.

Por otro lado, el modelo triple transgénico desarrollado en esta tesis en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Wandosell, nos ha permitido estudiar el papel de PrP^C en la acumulación del péptido A β . Los resultados obtenidos no mostraban diferencias significativas entre los animales KO y los WT. En cambio, en el modelo de sobreexpresión de PrP^C, el tg20, se observó un incremento de los niveles de A β y de su depósito. El modelo de EA utilizado, el APP/PS1, expresa APP humana con la mutación *Swedish*, y PrP^C afecta al procesamiento de APP por BACE1 pero en la forma WT, aunque quizás la sobreexpresión de PrP^C sí que pueda tener un efecto significativo en el procesamiento de APP con la mutación. Estas observaciones junto con el incremento en fosforilación de tau observado también al sobreexpresar PrP^C, sugieren que el aumento significativo de los niveles de PrP^C no produciría un efecto neuroprotector.

Nuestros resultados *in vivo* se han obtenido a edades comprendidas entre 1 y 9 meses. La edad es un factor importante en la enfermedad y los niveles tanto de A β , tau y PrP^C varían con el envejecimiento, y habría que descartar qué mecanismos compensatorios que se puedan estar produciendo en la enfermedad son propios de la edad y podrían llevar a confusiones en los resultados. Estudios a edades posteriores aportarían más información acerca de la relación de estas proteínas con la edad, y podría corroborar los resultados *in vitro*. Hay que tener en cuenta también que los niveles y el tipo de especies oligoméricas varían en el transcurso de la enfermedad (Lesne, 2014). Entonces, sería interesante determinar si los modelos actuales son capaces de reproducir estas fluctuaciones en los diferentes tipos de oligómeros, e intentar encontrar un modelo que permita estudiar el efecto de cada especie, a la edad correspondiente aproximada a la que aparecería en la enfermedad.

La zona correspondiente a los *octarepeats* de PrP^C podría ser relevante desde el punto de vista de la enfermedad. Resultados obtenidos en estudios como el de Crouch PJ 2009 muestran como al aumentar la biodisponibilidad de cobre intracelular, se inhibe GSK3 β a través de la activación de la vía de señalización de AKT (Crouch et al., 2009). GSK3 β fosforila algunos de los epítomos que hemos encontrado fosforilados en cultivos KO en presencia de ADDLs, de modo que quizás PrP^C, que es capaz de acumular cobre, esté implicado en la regulación de la fosforilación de estos epítomos de tau.

La acumulación de diferentes proteínas en la EA, podría estar relacionada con deficiencias en los sistemas de degradación de la célula. A nivel del péptido A β hemos realizado un estudio de la autofagia. Otro sistema implicado en la enfermedad es el sistema del proteasoma. Estudios utilizando inhibidores del proteasoma, como la lactacistina, utilizando un inhibidor de la síntesis proteica previamente, aportarían datos acerca de la implicación de este sistema en la acumulación

proteica. Al mismo tiempo, paralelamente se podría estudiar la autofagia en condiciones de inhibición del proteasoma, ya que hay evidencias de que al inhibir el proteasoma, puede producirse una sobrerregulación de la autofagia (Chesser et al., 2013). Otros estudios muestran como tau fosforilada podría unirse al proteasoma, inhibiendo así la degradación de tau por este sistema. Entonces, se podría inhibir la fosforilación proteica en un modelo celular, y observar si la propia fosforilación de la proteína está afectando a su degradación. Paralelamente, el mismo estudio con diferentes dosis de PrP^C también se podría realizar. Por último, existen dos chaperonas, hsp90, y hsp70, que regulan el proteasoma, de modo que se podría estudiar si PrP^C interacciona con estas chaperonas y participa en el proceso de degradación.

Queda por descubrir también la presencia de otros posibles receptores que actúen de mediadores de los oligómeros de A β . A pesar de que PrP^C es capaz de unirse de forma altamente eficaz a los oligómeros de A β en concentraciones nanomolares, el estudio de Lauren et al 2009 muestra como la unión de A β a neuronas de hipocampo se veía reducida solo un 50% en ausencia de PrP^C (Lauren et al., 2009). Estos datos sugieren la participación de otros mediadores, probablemente con menor afinidad, que podrían actuar cuando los niveles de PrP^C fueran disminuyendo, pero que en ese estudio no fueron identificados o estudiados por su quizás menor afinidad con A β . Buenos ejemplos serían los receptores de glutamato o mGluR5 (Renner et al., 2010).

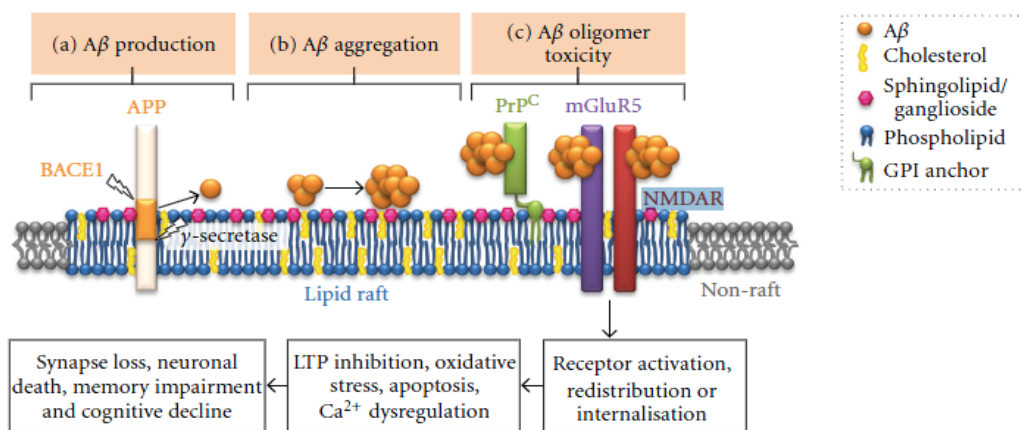


Figura 21. Posibles receptores alternativos de A β . Los receptores de NDMA y mGluR5 se encuentran, junto con PrP^C, en las balsas lipídicas, pudiendo mediar los efectos tóxicos de A β como la excitotoxicidad o la pérdida sináptica. Tomado de Rushworth 2010.

Estudios recientes han abierto una nueva línea de estudio. Ésta consiste en la posible participación de PrP^C en la supervivencia del modelo APP/PS1 relacionada con la aparición de episodios epilépticos, que serían los responsables de la elevada mortalidad en este modelo (Um et al., 2012). Nuestros resultados no corroboran estos datos, ya que los animales no mostraron una mayor supervivencia en ausencia de PrP^C. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran un incremento de susceptibilidad a ácido kaínico (KA) en el animal PrPKO, corroborado también *in vitro* (Carulla et al., 2011). El KA, es un potente aminoácido capaz de activar los receptores de glutamato, que se utiliza como modelo de excitotoxicidad y en el estudio de la epilepsia para inducir episodios epilépticos. Una posible línea de estudio podría consistir en administrar kainato a los animales transgénicos APP/PS1 con diferentes dosis de PrP^C, para inducir estos ataques epilépticos y estudiar el papel de PrP^C en la mortalidad inducida en el modelo APP/PS1 por los episodios epilépticos. (Roberson et al., 2007, Roberson et al., 2011, Um et al., 2012)

A nivel terapéutico, la estrategia presentada en esta tesis abre la puerta a un posible inhibidor de BACE1, aunque estudios posteriores estarán encaminados a determinar tanto el mecanismo de regulación de los niveles de A β como el mecanismo de elongación neurítica. A nivel farmacológico, es muy importante determinar la dosis correcta. Como ya se ha comentado hay varios inhibidores en fases clínicas. Uno de los puntos a tener en cuenta, es la toxicidad derivada de este tipo de moléculas *in vivo*, que habrá que estudiar en profundidad en estudios preclínicos. Además, otro punto en el cual habrá que profundizar, es un posible efecto secundario, por el papel fisiológico de BACE1, de forma que también es relevante obtener un buen nivel de inhibición para no afectar a sus funciones biológicas. El desarrollo de inhibidores de BACE1 conciernen tanto el nivel de inhibición como el estadio de la enfermedad al que es conveniente administrarlo para conseguir una eficacia óptima.

A un nivel más general, es necesario seguir mejorando los actuales modelos e intentar reproducir la enfermedad en condiciones más fidedignas a las que encontramos en las formas esporádicas, puesto que los modelos actuales muestran mutaciones presentes en las formas familiares. En esta discusión se han descrito varias diferencias presentes en las formas familiares respecto a las esporádicas, y más recientemente las diferencias de modulación de PrP^C sobre BACE1 dependientes de la presencia de mutaciones en APP. El genotipo de los animales puede jugar un papel importante en los resultados obtenidos, así como la naturaleza de los promotores que dirigen la expresión génica en cada modelo. La mejora en los modelos tendrá que ir acompañada de mejoras en la resolución de las diferentes técnicas utilizadas a nivel de laboratorio para estudiar estos modelos, puesto que los cambios que aparecen al inicio de la enfermedad se localizan en poblaciones celulares en pequeñas regiones cerebrales, que al estudiar el cerebro como una entidad entera pueden pasar desapercibidos.

A nivel técnico, los diferentes tests utilizados tanto para el análisis de parámetros relacionados con funciones cognitivas como la memoria, y los diferentes protocolos utilizados para procesar las muestras a nivel molecular, tanto técnicas como el uso de diferentes anticuerpos por ejemplo, también introducen variaciones en los resultados obtenidos. También es necesario estandarizar el protocolo de obtención de oligómeros, puesto que estas diferencias pueden ser la base de algunas de las discrepancias publicadas y que dificultan la interpretación de los datos o la obtención de conclusiones firmes (Hernandez-Rapp et al., 2014).

Por último, estudios tipo *genome wide association*, permiten encontrar nuevos genes relacionados con el riesgo de aparición de la enfermedad y abren nuevas puertas en el estudio de sus causas. El conocimiento de estos genes de elevada susceptibilidad permite desarrollar aproximaciones como la que se está llevando a cabo para testar una terapia anti-amiloideogénica en pacientes con elevada susceptibilidad genética a padecer Alzheimer, pero sin síntomas. Este estudio, de tener éxito, aportará información útil acerca de los efectos de impedir el depósito amiloide antes de que éste se produzca, que abrirá, a su vez, debates éticos acerca de si todas las personas con susceptibilidad genética deberán ser tratadas de forma rutinaria, o de si el coste del tratamiento podrá llegar a todos los que lo necesiten.

CONCLUSIONES

- 1) La ausencia de PrP^C en cultivos primarios, aumenta la susceptibilidad a la fosforilación de tau en presencia de ADDLs. PrP^C reduce los efectos tóxicos de los ADDLs modulando los niveles de tau.
- 2) Los oligómeros y no las especies insolubles de A β , son los responsables de los cambios observados en los niveles de tau y su fosforilación.
- 3) Existe una correlación entre la sobreexpresión de PrP^C y un aumento en los niveles de A β , la densidad de placas, y el ratio A β ₄₂/A β ₄₀, que no se ha mostrado en los animales *knockout* y WT para PrP^C.
- 4) Existe una correlación entre los niveles de PrP^C y los niveles de tau tanto en muestras procedentes de animales APP/PS1 como de pacientes de Alzheimer. Los niveles de ambas proteínas aumentan al inicio de la enfermedad y sus niveles disminuyen en los siguientes estadios, sugiriendo un papel regulador de PrP^C.
- 5) El depósito de A β no interviene en la infectividad del prión, en animales APP/PS1 inoculados con las cepas 22L y BSE adaptada a ratón
- 6) PrP^C no produce cambios significativos en los niveles totales de las proteínas PSD-95 y sinapsina, descartando su implicación en la pérdida sináptica mediada por A β .
- 7) Los γ -péptidos derivados de prolina muestran una baja toxicidad en cultivos primarios, inducen un crecimiento axonal y disminuyen los niveles de A β que correlacionan con una menor actividad de BACE1 en cultivos primarios.
- 8) El péptido P33 es capaz de reducir los niveles de A β *in vivo* en el modelo de Alzheimer APP/PS1, presentándose como una alternativa a las actuales terapias.

BIBLIOGRAFÍA

- Abisambra J, Jinwal UK, Miyata Y, Rogers J, Blair L, Li X, Seguin SP, Wang L, Jin Y, Bacon J, Brady S, Cockman M, Guidi C, Zhang J, Koren J, Young ZT, Atkins CA, Zhang B, Lawson LY, Weeber EJ, Brodsky JL, Gestwicki JE, Dickey CA (2013) Allosteric heat shock protein 70 inhibitors rapidly rescue synaptic plasticity deficits by reducing aberrant tau. *Biol Psychiatry* 74:367-374.
- Abisambra JF, Jinwal UK, Jones JR, Blair LJ, Koren J, 3rd, Dickey CA (2011) Exploiting the diversity of the heat-shock protein family for primary and secondary tauopathy therapeutics. *Current neuropharmacology* 9:623-631.
- Abramowski D, Wiederhold KH, Furrer U, Jatton AL, Neuenschwander A, Runser MJ, Danner S, Reichwald J, Ammatturo D, Staab D, Stoeckli M, Rueeger H, Neumann U, Staufenbiel M (2008) Dynamics of Abeta turnover and deposition in different beta-amyloid precursor protein transgenic mouse models following gamma-secretase inhibition. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 327:411-424.
- Agostini F, Dotti CG, Perez-Canamas A, Ledesma MD, Benetti F, Legname G (2013) Prion protein accumulation in lipid rafts of mouse aging brain. *PLoS one* 8:e74244.
- Aguzzi A, Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiological reviews* 89:1105-1152.
- Aguzzi A, Haass C (2003) Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* 302:814-818.
- Aisen PS, Gauthier S, Vellas B, Briand R, Saumier D, Laurin J, Garceau D (2007) Alzhemed: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* 4:473-478.
- Alberca R, López-Pousa, S. (2011) Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias.
- Almkvist O, Basun H, Backman L, Herlitz A, Lannfelt L, Small B, Viitanen M, Wahlund LO, Winblad B (1998) Mild cognitive impairment--an early stage of Alzheimer's disease? *J Neural Transm Suppl* 54:21-29.
- Alonso Adel C, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2006) Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:8864-8869.
- Alzualde A, Indakoetxea B, Ferrer I, Moreno F, Barandiaran M, Gorostidi A, Estanga A, Ruiz I, Calero M, van Leeuwen FW, Atares B, Juste R, Rodriguez-Martinez AB, Lopez de Munain A (2010a) A novel PRNP Y218N mutation in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:789-800.
- Alzualde A, Moreno F, Martinez-Lage P, Ferrer I, Gorostidi A, Otaegui D, Blazquez L, Atares B, Cardoso S, Martinez de Pancorbo M, Juste R, Rodriguez-Martinez AB, Indakoetxea B, Lopez de Munain A (2010b) Somatic mosaicism in a case of apparently sporadic Creutzfeldt-Jakob disease carrying a de novo D178N mutation in the PRNP gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:1283-1291.
- Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of neuroscience research* 74:342-352.
- Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K, Albert M, Brandt J, Stern Y (2006) Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia* 47:867-872.
- Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P (2005) Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:5446-5454.
- Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23:3585-3593.
- Anliker B, Muller U (2006) The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3:239-246.
- Antonyuk SV, Trevitt CR, Strange RW, Jackson GS, Sangar D, Batchelor M, Cooper S, Fraser C, Jones S, Georgiou T, Khalili-Shirazi A, Clarke AR, Hasnain SS, Collinge J (2009) Crystal structure of

- human prion protein bound to a therapeutic antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:2554-2558.
- Aranda-Anzaldo A (1992) Possible cell-free prion replication. *Med Hypotheses* 38:249-251.
- Arrasate M, Perez M, Avila J (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* 25:43-50.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
- Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM (2007) Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9115-9129.
- Avila J (2000) Tau aggregation into fibrillar polymers: tauopathies. *FEBS letters* 476:89-92.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological reviews* 84:361-384.
- Baier M, Apelt J, Riemer C, Gultner S, Schwarz A, Bamme T, Burwinkel M, Schliebs R (2008) Prion infection of mice transgenic for human APPSwe: increased accumulation of cortical formic acid extractable Abeta(1-42) and rapid scrapie disease development. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26:821-824.
- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:2295-2300.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6:916-919.
- Barmada S, Piccardo P, Yamaguchi K, Ghetti B, Harris DA (2004) GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiology of disease* 16:527-537.
- Barnham KJ, Cappai R, Beyreuther K, Masters CL, Hill AF (2006) Delineating common molecular mechanisms in Alzheimer's and prion diseases. *Trends Biochem Sci* 31:465-472.
- Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, Walsh DM, Rowan MJ (2011) Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:7259-7263.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-428.
- Basurto-Islas G, Luna-Munoz J, Guillozet-Bongaarts AL, Binder LI, Mena R, Garcia-Sierra F (2008) Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:470-483.
- Bate C, Williams A (2011) Amyloid-beta-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. *The Journal of biological chemistry* 286:37955-37963.
- Bateman RJ, Siemers ER, Mawuenyega KG, Wen G, Browning KR, Sigurdson WC, Yarasheski KE, Friedrich SW, Demattos RB, May PC, Paul SM, Holtzman DM (2009) A gamma-secretase inhibitor decreases amyloid-beta production in the central nervous system. *Ann Neurol* 66:48-54.

- Bechara C, Sagan S (2013) Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters* 587:1693-1702.
- Beekes M, McBride PA (2007) The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J* 274:588-605.
- Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E, Citron M, Vassar R (2000) Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *The Journal of biological chemistry* 275:20647-20651.
- Benvegnu S, Roncaglia P, Agostini F, Casalone C, Corona C, Gustincich S, Legname G (2011) Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. *Physiol Genomics* 43:711-725.
- Beringue V, Mallinson G, Kaiser M, Tayebi M, Sattar Z, Jackson G, Anstee D, Collinge J, Hawke S (2003) Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain* 126:2065-2073.
- Bertram L, Tanzi RE (2004) The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 50:385-396.
- Bertram L, Tanzi RE (2008) Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9:768-778.
- Beyer N, Coulson DT, Heggarty S, Ravid R, Hellemans J, Irvine GB, Johnston JA (2012) Zinc transporter mRNA levels in Alzheimer's disease postmortem brain. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 29:863-873.
- Bhaskar K, Hobbs GA, Yen SH, Lee G (2010) Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. *Neuropathology and applied neurobiology* 36:462-477.
- Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA (2012) Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci* 35:92-103.
- Boland B, Smith DA, Mooney D, Jung SS, Walsh DM, Platt FM (2010) Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry* 285:37415-37426.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.
- Braak H, Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of aging* 16:271-278; discussion 278-284.
- Braak H, Braak E (1996) Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum* 165:3-12.
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379:339-343.
- Brandt R, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77:71-94.
- Brown DR (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 24:85-90.
- Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *Journal of neuroscience research* 67:211-224.
- Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 146:104-112.
- Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* 344 Pt 1:1-5.
- Brown MR, Bondada V, Keller JN, Thorpe J, Geddes JW (2005) Proteasome or calpain inhibition does not alter cellular tau levels in neuroblastoma cells or primary neurons. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 7:15-24.

- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain research Brain research reviews* 33:95-130.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-582.
- Burack MA, Halpain S (1996) Site-specific regulation of Alzheimer-like tau phosphorylation in living neurons. *Neuroscience* 72:167-184.
- Burton EJ, Barber R, Mukaetova-Ladinska EB, Robson J, Perry RH, Jaros E, Kalaria RN, O'Brien JT (2009) Medial temporal lobe atrophy on MRI differentiates Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies and vascular cognitive impairment: a prospective study with pathological verification of diagnosis. *Brain* 132:195-203.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yankner BA (1992) Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiology of aging* 13:609-612.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879-888.
- Buxbaum JD, Christensen JL, Ruefli AA, Greengard P, Loring JF (1993) Expression of APP in brains of transgenic mice containing the entire human APP gene. *Biochem Biophys Res Commun* 197:639-645.
- Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Verclletto M, De la Fourniere F, Thomas-Anterion C, Verny C, Letournel F, Pasquier F, Vital A, Checler F, Frebourg T, Champion D, Hannequin D (2006) Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain* 129:2966-2976.
- Cacabelos R, Takeda M, Winblad B (1999) The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 14:3-47.
- Caetano FA, Beraldo FH, Hajj GN, Guimaraes AL, Jurgensen S, Wasilewska-Sampaio AP, Hirata PH, Souza I, Machado CF, Wong DY, De Felice FG, Ferreira ST, Prado VF, Rylett RJ, Martins VR, Prado MA (2011) Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. *Journal of neurochemistry* 117:538-553.
- Cai Y, Zhang XM, Macklin LN, Cai H, Luo XG, Oddo S, Laferla FM, Struble RG, Rose GM, Patrylo PR, Yan XX (2012) BACE1 elevation is involved in amyloid plaque development in the triple transgenic model of Alzheimer's disease: differential Abeta antibody labeling of early-onset axon terminal pathology. *Neurotox Res* 21:160-174.
- Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, Prochiantz A (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131:2173-2181.
- Calella AM, Farinelli M, Nuvolone M, Mirante O, Moos R, Falsig J, Mansuy IM, Aguzzi A (2010) Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* 2:306-314.
- Canu N, Calissano P (2003) In vitro cultured neurons for molecular studies correlating apoptosis with events related to Alzheimer disease. *Cerebellum* 2:270-278.
- Canu N, Filesi I, Pristera A, Ciotti MT, Biocca S (2011) Altered intracellular distribution of PrPC and impairment of proteasome activity in tau overexpressing cortical neurons. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 27:603-613.
- Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Carbajo D (2012) g-peptides based on proline derivatives: novel applications and secondary structure. p 223.
- Carulla P, Bribian A, Rangel A, Gavin R, Ferrer I, Caelles C, Del Rio JA, Llorens F (2011) Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Mol Biol Cell* 22:3041-3054.
- Cisse M, Sanchez PE, Kim DH, Ho K, Yu GQ, Mucke L (2011) Ablation of cellular prion protein does not ameliorate abnormal neural network activity or cognitive dysfunction in the J20 line of

- human amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:10427-10431.
- Citron M (2010) Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 9:387-398.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11:909-913.
- Coitinho AS, Dietrich MO, Hoffmann A, Dall'Igna OP, Souza DO, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I, Lara DR (2002) Decreased hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP(C)). *Brain research Molecular brain research* 107:190-194.
- Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2006) The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *The European journal of neuroscience* 24:3255-3264.
- Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I (2003) Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport* 14:1375-1379.
- Colby DW, Prusiner SB (2011) Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a006833.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370:295-297.
- Collins SJ, Lawson VA, Masters CL (2004) Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363:51-61.
- Combarros O, Sanchez-Guerra M, Llorca J, Alvarez-Arcaya A, Berciano J, Pena N, Fernandez-Viadero C (2000) Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene is not associated with sporadic AD. *Neurology* 55:593-595.
- Contestabile A (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum* 1:41-55.
- Contestabile A (2011) The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res* 221:334-340.
- Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH, Zismann VL, Beach TG, Leung D, Bryden L, Halperin RF, Marlowe L, Kaleem M, Walker DG, Ravid R, Heward CB, Rogers J, Papassotiropoulos A, Reiman EM, Hardy J, Stephan DA (2007) A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 68:613-618.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiology of disease* 19:255-265.
- Crouch PJ, Hung LW, Adlard PA, Cortes M, Lal V, Filiz G, Perez KA, Nurjono M, Caragounis A, Du T, Loughton K, Volitakis I, Bush AI, Li QX, Masters CL, Cappai R, Cherny RA, Donnelly PS, White AR, Barnham KJ (2009) Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:381-386.
- Cuadrado-Tejedor M, Irujo A, Paternain B, Madrid M, Velayos JL (2011) Cellular Prion Protein and Sexual Dimorphic Areas in Rodents. Correlates with Alzheimer Disease. *Neuroscience & Medicine* 2:384-391.
- Curtis J, Errington M, Bliss T, Voss K, MacLeod N (2003) Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. *Neurobiology of disease* 13:55-62.
- Chalmers K, Wilcock GK, Love S (2003) APOE epsilon 4 influences the pathological phenotype of Alzheimer's disease by favouring cerebrovascular over parenchymal accumulation of A beta protein. *Neuropathology and applied neurobiology* 29:231-238.

- Chandler RL (1961) Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1:1378-1379.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2:271-276.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al. (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844-846.
- Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blattler T, Aguzzi A, Kopp N (1996) New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 347:1181.
- Checler F, Vincent B (2002) Alzheimer's and prion diseases: distinct pathologies, common proteolytic denominators. *Trends Neurosci* 25:616-620.
- Chen M, Kretschmar, D., Verdile, G., Lardelli, M. (2013) Models of Alzheimer's disease. In: *Animal Models for the Study of Human Disease*, Elsevier.
- Chen RJ, Chang WW, Lin YC, Cheng PL, Chen YR (2013) Alzheimer's amyloid-beta oligomers rescue cellular prion protein induced tau reduction via the Fyn pathway. *ACS chemical neuroscience* 4:1287-1296.
- Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003) Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22:227-233.
- Chen S, Yadav SP, Surewicz WK (2010) Interaction between human prion protein and amyloid-beta (A β) oligomers: role OF N-terminal residues. *The Journal of biological chemistry* 285:26377-26383.
- Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L (1995) Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *The Journal of biological chemistry* 270:19173-19180.
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308:1435-1439.
- Chesser AS, Pritchard SM, Johnson GV (2013) Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Frontiers in neurology* 4:122.
- Chin J, Palop JJ, Puolivali J, Massaro C, Bien-Ly N, Gerstein H, Searce-Levie K, Masliah E, Mucke L (2005) Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:9694-9703.
- Chung E, Ji Y, Sun Y, Kascsak RJ, Kascsak RB, Mehta PD, Strittmatter SM, Wisniewski T (2010) Anti-PrPC monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. *BMC Neurosci* 11:130.
- Dahm R (2006) Alzheimer's discovery. *Current biology* : CB 16:R906-910.
- Danysz W, Parsons CG (2003) The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry* 18:S23-32.
- Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G (2000) Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res* 2:85-97.
- Daude N, Westaway D (2011) Biological properties of the PrP-like Shadoo protein. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:1505-1516.
- David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG (2002) Proteasomal degradation of tau protein. *Journal of neurochemistry* 83:176-185.
- Davidson BL, Breakefield XO (2003) Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4:353-364.

- Dawkins E, Small DH (2014) Insights into the physiological function of the beta-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 129:756-769.
- De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiology of aging* 29:1334-1347.
- De Jonghe C, Zehr C, Yager D, Prada CM, Younkin S, Hendriks L, Van Broeckhoven C, Eckman CB (1998) Flemish and Dutch mutations in amyloid beta precursor protein have different effects on amyloid beta secretion. *Neurobiology of disease* 5:281-286.
- De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12.
- De Strooper B, Simons M, Multhaup G, Van Leuven F, Beyreuther K, Dotti CG (1995) Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *The EMBO journal* 14:4932-4938.
- De Strooper B, Vassar R, Golde T (2010) The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature reviews Neurology* 6:99-107.
- DeArmond SJ, McKinley MP, Barry RA, Braunfeld MB, McColloch JR, Prusiner SB (1985) Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* 41:221-235.
- DeArmond SJ, Qiu Y, Sanchez H, Spilman PR, Ninchak-Casey A, Alonso D, Daggett V (1999) PrPc glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1000-1009.
- Debatin L, Streffer J, Geissen M, Matschke J, Aguzzi A, Glatzel M (2008) Association between deposition of beta-amyloid and pathological prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurodegener Dis* 5:347-354.
- Delobel P, Leroy O, Hamdane M, Sambo AV, Delacourte A, Buee L (2005) Proteasome inhibition and Tau proteolysis: an unexpected regulation. *FEBS letters* 579:1-5.
- Delrieu J, Ousset PJ, Caillaud C, Vellas B (2012) 'Clinical trials in Alzheimer's disease': immunotherapy approaches. *Journal of neurochemistry* 120 Suppl 1:186-193.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001) Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8850-8855.
- Deng Q, Cai W, Li S, Zhang Y, Su B (2013) Small Nogo-66-binding peptide promotes neurite outgrowth through RhoA inhibition after spinal cord injury. *Brain Res Bull* 99:140-144.
- Dermaut B, Croes EA, Rademakers R, Van den Broeck M, Cruts M, Hofman A, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2003) PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 53:409-412.
- Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006) Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:6011-6018.
- Detwiler LA (1992) Scrapie. *Rev Sci Tech* 11:491-537.
- Dimitriadi M, Hart AC (2010) Neurodegenerative disorders: insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of disease* 40:4-11.
- Dodart JC, Meziane H, Mathis C, Bales KR, Paul SM, Ungerer A (1999) Behavioral disturbances in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Behavioral neuroscience* 113:982-990.
- Dotti CG, Banker GA, Binder LI (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23:121-130.
- Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123.

- Ermonval M, Mouillet-Richard S, Codogno P, Kellermann O, Botti J (2003) Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. *Biochimie* 85:33-45.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124.
- Esterhazy D, Stutzer I, Wang H, Rechsteiner MP, Beauchamp J, Dobeli H, Hilpert H, Matile H, Prummer M, Schmidt A, Lieske N, Boehm B, Marselli L, Bosco D, Kerr-Conte J, Aebersold R, Spinass GA, Moch H, Migliorini C, Stoffel M (2011) Bace2 is a beta cell-enriched protease that regulates pancreatic beta cell function and mass. *Cell metabolism* 14:365-377.
- Ewers M, Cheng X, Zhong Z, Nural HF, Walsh C, Meindl T, Teipel SJ, Buerger K, He P, Shen Y, Hampel H (2011) Increased CSF-BACE1 activity associated with decreased hippocampus volume in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 25:373-381.
- Farlow MR, Brosch JR (2013) Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Neurol Clin* 31:869-878.
- Farrera-Sinfreu J, Giralt E, Castel S, Albericio F, Royo M (2005) Cell-penetrating cis-gamma-amino-L-proline-derived peptides. *Journal of the American Chemical Society* 127:9459-9468.
- Farrera-Sinfreu J, Zaccaro L, Vidal D, Salvatella X, Giralt E, Pons M, Albericio F, Royo M (2004) A new class of foldamers based on cis-gamma-amino-L-proline. *Journal of the American Chemical Society* 126:6048-6057.
- Fernandez-Carneado J, Kogan MJ, Castel S, Giralt E (2004) Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:1811-1814.
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Puig B, Ribera R, Rey MJ, Ribalta T (2001) Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 101:49-56.
- Feuillet S, Blard O, Lecourtois M, Frebourg T, Campion D, Dumanchin C (2005) Tau is not normally degraded by the proteasome. *Journal of neuroscience research* 80:400-405.
- Fioriti L, Dossena S, Stewart LR, Stewart RS, Harris DA, Forloni G, Chiesa R (2005) Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *The Journal of biological chemistry* 280:11320-11328.
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *The EMBO journal* 15:1255-1264.
- Forman M, Kleijn H-J, Dockendorf M, Palcza J, Tseng J, Canales C, Egan M, Kennedy M, Laterza O, Ma L, Scott J, Tanen M, Apter J, Backonja M, Ereshefsky L, Gevorkyan H, Jhee S, Rynders R, Zari A, Bryan E, Wagner J, Troyer M, Stone J (2013) The novel BACE inhibitor MK-8931 dramatically lowers CSF beta-amyloid in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 9:P139.
- Forman M, Palcza J, Tseng J, Leempoels J, Ramael S, Han D, Jhee S, Ereshefsky L, Tanen M, Laterza O, Dockendorf M, Krishna G, Ma L, Wagner J, Troyer M (2012) The novel BACE inhibitor MK-8931 dramatically lowers cerebrospinal fluid A β peptides in healthy subjects following single- and multiple-dose administration. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 8:P704.
- Fournier JG (2008) Cellular prion protein electron microscopy: attempts/limits and clues to a synaptic trait. Implications in neurodegeneration process. *Cell and tissue research* 332:1-11.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V (2000) Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc Res Tech* 50:76-88.
- Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55:1189-1193.
- Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, Panico S, Mc Donald JM, Risse E, Asante EA, Farrow MA, Sessions RB, Saibil HR, Clarke AR, Rowan MJ, Walsh DM, Collinge J (2011) Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nature communications* 2:336.

- Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002) Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 59:1381-1389.
- Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197:943-960.
- Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG (2003) Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* 66:213-239.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP (2006) Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of disease* 24:516-524.
- Garcia T, Jay D (2004) [Phosphorylation of tau and Alzheimer's disease]. *Gac Med Mex* 140:329-333.
- Gasperini L, Legname G (2014) Prion protein and aging. *Frontiers in cell and developmental biology* 2:44.
- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *The EMBO journal* 20:5863-5875.
- Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J (2014) 2014 Alzheimer's Disease Facts and Figures. In: *Alzheimer's & Dementia*, vol. 10, p 77.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* 19:177-181.
- Gervais F, Chalifour R, Garceau D, Kong X, Laurin J, McLaughlin R, Morissette C, Paquette J (2001) Glycosaminoglycan mimetics: a therapeutic approach to cerebral amyloid angiopathy. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 8 Suppl 1:28-35.
- Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, Lacombe D, Kong X, Aman A, Laurin J, Szarek WA, Tremblay P (2007) Targeting soluble Aβ peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiology of aging* 28:537-547.
- Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 4:827-831.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM (2005) Clinical effects of Aβ immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64:1553-1562.
- Gill AC, Ritchie MA, Hunt LG, Steane SE, Davies KG, Bocking SP, Rhie AG, Bennett AD, Hope J (2000) Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure in vivo. *The EMBO journal* 19:5324-5331.
- Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Lauren J, Gimbel ZA, Strittmatter SM (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:6367-6374.
- Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A (2003) Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 349:1812-1820.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Goedert M, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Hill F (1996) PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 109 (Pt 11):2661-2672.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem

- repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO journal* 8:393-399.
- Goh AX, Li C, Sy MS, Wong BS (2007) Altered prion protein glycosylation in the aging mouse brain. *Journal of neurochemistry* 100:841-854.
- Golanska E, Hulas-Bigoszewska K, Rutkiewicz E, Styczynska M, Peplonska B, Barcikowska M, Bratosiewicz-Wasik J, Liberski PP (2004) Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD. *Neurology* 62:313-315.
- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10417-10422.
- Goni F, Herline K, Peyser D, Wong K, Ji Y, Sun Y, Mehta P, Wisniewski T (2013) Immunomodulation targeting of both A beta and tau pathological conformers ameliorates Alzheimer's disease pathology in TgSwDI and 3xTg mouse models. *Journal of neuroinflammation* 10:150.
- Gotz J, Gladbach A, Pennanen L, van Eersel J, Schild A, David D, Ittner LM (2010) Animal models reveal role for tau phosphorylation in human disease. *Biochimica et biophysica acta* 1802:860-871.
- Grace EA, Rabiner CA, Busciglio J (2002) Characterization of neuronal dystrophy induced by fibrillar amyloid beta: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 114:265-273.
- Green M, Ishino M, Loewenstein PM (1989) Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* 58:215-223.
- Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH (2009) Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Jama* 302:2557-2564.
- Griffiths HH, Whitehouse IJ, Baybutt H, Brown D, Kellett KA, Jackson CD, Turner AJ, Piccardo P, Manson JC, Hooper NM (2011) Prion protein interacts with BACE1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and Swedish mutant amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry* 286:33489-33500.
- Griffiths HH, Whitehouse IJ, Hooper NM (2012) Regulation of amyloid-beta production by the prion protein. *Prion* 6:217-222.
- Grune T, Botzen D, Engels M, Voss P, Kaiser B, Jung T, Grimm S, Ermak G, Davies KJ (2010) Tau protein degradation is catalyzed by the ATP/ubiquitin-independent 20S proteasome under normal cell conditions. *Arch Biochem Biophys* 500:181-188.
- Gu Y, Oyama F, Ihara Y (1996) Tau is widely expressed in rat tissues. *Journal of neurochemistry* 67:1235-1244.
- Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Brunden KR (1995) Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *The Journal of biological chemistry* 270:18666-18671.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270.
- Hagiwara K, Hara H, Hanada K (2013) Species-barrier phenomenon in prion transmissibility from a viewpoint of protein science. *Journal of biochemistry* 153:139-145.
- Hall AM, Roberson ED (2012) Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 88:3-12.
- Hampel H, Shen Y (2009) Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) as a biological candidate marker of Alzheimer's disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 69:8-12.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in molecular medicine* 15:112-119.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488-491.

- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, et al. (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274:1-13.
- Hardy J (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *Journal of neurochemistry* 110:1129-1134.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
- Harris DA (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* 66:71-85.
- He W, Lu Y, Qahwash I, Hu XY, Chang A, Yan R (2004) Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat Med* 10:959-965.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfner DP, Muller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:7951-7963.
- Hebert SS, Serneels L, DeJaegere T, Horre K, Dabrowski M, Baert V, Annaert W, Hartmann D, De Strooper B (2004) Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiology of disease* 17:260-272.
- Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279:827-834.
- Hegde RS, Tremblay P, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402:822-826.
- Hernandez-Rapp J, Martin-Lannere S, Hirsch TZ, Launay JM, Mouillet-Richard S (2014) Hijacking PrP(c)-dependent signal transduction: when prions impair Abeta clearance. *Frontiers in aging neuroscience* 6:25.
- Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, Umans L, Schrijvers V, Checler F, Vanderstichele H, Baekelandt V, Dressel R, Cupers P, Huylebroeck D, Zwijsen A, Van Leuven F, De Strooper B (1999) Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11872-11877.
- Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J (1997) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349:99-100.
- Hitt B, Riordan SM, Kukreja L, Eimer WA, Rajapaksha TW, Vassar R (2012) beta-Site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1 (BACE1)-deficient mice exhibit a close homolog of L1 (CHL1) loss-of-function phenotype involving axon guidance defects. *The Journal of biological chemistry* 287:38408-38425.
- Ho GJ, Hashimoto M, Adame A, Izu M, Alford MF, Thal LJ, Hansen LA, Masliah E (2005) Altered p59Fyn kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role. *Neurobiology of aging* 26:625-635.
- Hoe HS, Fu Z, Makarova A, Lee JY, Lu C, Feng L, Pajoohesh-Ganji A, Matsuoka Y, Hyman BT, Ehlers MD, Vicini S, Pak DT, Rebeck GW (2009) The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *The Journal of biological chemistry* 284:8495-8506.
- Holtzman DM, Mandelkow E, Selkoe DJ (2012) Alzheimer disease in 2020. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Hollingsworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvin V, Dowzell K, Jones N, Stretton A, Thomas C, Richards A, Ivanov D, Widdowson C, Chapman J, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Beaumont H, Warden D, Wilcock G, Love S, Kehoe

- PG, Hooper NM, Vardy ER, Hardy J, Mead S, Fox NC, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Ruther E, Schurmann B, Heun R, Kolsch H, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frolich L, Hampel H, Gallacher J, Hull M, Rujescu D, Giegling I, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Muhleisen TW, Nothen MM, Moebus S, Jockel KH, Klopp N, Wichmann HE, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC, van Duijn CM, Breteler MM, Ikram MA, DeStefano AL, Fitzpatrick AL, Lopez O, Launer LJ, Seshadri S, Berr C, Champion D, Epelbaum J, Dartigues JF, Tzourio C, Alperovitch A, Lathrop M, Feulner TM, Friedrich P, Riehle C, Krawczak M, Schreiber S, Mayhaus M, Nicolhaus S, Wagenpfeil S, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Snaedal J, Bjornsson S, Jonsson PV, Chouraki V, Genier-Boley B, Hiltunen M, Soininen H, Combarros O, Zelenika D, Delepine M, Bullido MJ, Pasquier F, Mateo I, Frank-Garcia A, Porcellini E, Hanon O, Coto E, Alvarez V, Bosco P, Siciliano G, Mancuso M, Panza F, Solfrizzi V, Nacmias B, Sorbi S, Bossu P, Piccardi P, Arosio B, Annoni G, Seripa D, Pilotto A, Scarpini E, Galimberti D, Brice A, Hannequin D, Licastrò F, Jones L, Holmans PA, Jonsson T, Riemenschneider M, Morgan K, Younkin SG, Owen MJ, O'Donovan M, Amouyel P, Williams J (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:429-435.
- Hong-Qi Y, Zhi-Kun S, Sheng-Di C (2012) Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Abeta and tau. *Transl Neurodegener* 1:21.
- Hooper C, Killick R, Lovestone S (2008a) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 104:1433-1439.
- Hooper NM, Taylor DR, Watt NT (2008b) Mechanism of the metal-mediated endocytosis of the prion protein. *Biochem Soc Trans* 36:1272-1276.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Hu W, Kieseier B, Frohman E, Eagar TN, Rosenberg RN, Hartung HP, Stuve O (2008a) Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. *J Neurol Sci* 264:1-8.
- Hu X, He W, Diaconu C, Tang X, Kidd GJ, Macklin WB, Trapp BD, Yan R (2008b) Genetic deletion of BACE1 in mice affects remyelination of sciatic nerves. *FASEB J* 22:2970-2980.
- Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9:1520-1525.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I (2009) Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 118:53-69.
- Irminger-Finger I, Laymon RA, Goldstein LS (1990) Analysis of the primary sequence and microtubule-binding region of the Drosophila 205K MAP. *J Cell Biol* 111:2563-2572.
- Jaeger PA, Pickford F, Sun CH, Lucin KM, Masliah E, Wyss-Coray T (2010) Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PloS one* 5:e11102.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Human molecular genetics* 13:159-170.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomolecular engineering* 17:157-165.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (2000) A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.

- Jimenez-Huete A, Lievens PM, Vidal R, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Frangione B, Prelli F (1998) Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am J Pathol* 153:1561-1572.
- Jinwal UK, Akoury E, Abisambra JF, O'Leary JC, 3rd, Thompson AD, Blair LJ, Jin Y, Bacon J, Nordhues BA, Cockman M, Zhang J, Li P, Zhang B, Borysov S, Uversky VN, Biernat J, Mandelkow E, Gestwicki JE, Zweckstetter M, Dickey CA (2013) Imbalance of Hsp70 family variants fosters tau accumulation. *FASEB J* 27:1450-1459.
- Johannes L, Lamaze C (2002) Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* 3:443-451.
- Johnson-Wood K, Lee M, Motter R, Hu K, Gordon G, Barbour R, Khan K, Gordon M, Tan H, Games D, Lieberburg I, Schenk D, Seubert P, McConlogue L (1997) Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:1550-1555.
- Johnston JA, Liu WW, Todd SA, Coulson DT, Murphy S, Irvine GB, Passmore AP (2005) Expression and activity of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 33:1096-1100.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jonsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488:96-99.
- Jucker M, Beyreuther, K., Haass, C., Nitsch, R.M., Christen, Y. (2006) Alzheimer: 100 Years and Beyond. Heidelberg, Germany.
- Jun G, Naj AC, Beecham GW, Wang LS, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Ertekin-Taner N, Fallin MD, Friedland R, Inzelberg R, Kramer P, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Cantwell LB, Dombroski BA, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Lunetta KL, Martin ER, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Beekly D, Cupples LA, Hakonarson H, Kukull W, Foroud TM, Haines J, Mayeux R, Farrer LA, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD (2010) Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Archives of neurology* 67:1473-1484.
- Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA, Zhao J, Nicholson DA, Vassar R (2013) The Alzheimer's beta-secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol* 126:329-352.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10:698-712.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001) Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:372-381.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486-489.
- Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 85:115-122.
- Keller JN, Gee J, Ding Q (2002) The proteasome in brain aging. *Ageing research reviews* 1:279-293.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 75:436-439.

- Kellett KA, Hooper NM (2009) Prion protein and Alzheimer disease. *Prion* 3:190-194.
- Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R (2010) The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* 466:E3-4; discussion E4-5.
- Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemaire M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The Journal of general physiology* 131:i5.
- Kiachopoulos S, Bracher A, Winklhofer KF, Tatzelt J (2005) Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor. *The Journal of biological chemistry* 280:9320-9329.
- Kimura R, Ohno M (2009) Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiology of disease* 33:229-235.
- Kitamoto T, Tateishi J, Tashima T, Takeshita I, Barry RA, DeArmond SJ, Prusiner SB (1986) Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann Neurol* 20:204-208.
- Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry international* 41:345-352.
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE (2001) Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24:219-224.
- Kobayashi D, Zeller M, Cole T, Buttini M, McConlogue L, Sinha S, Freedman S, Morris RG, Chen KS (2008) BACE1 gene deletion: impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 29:861-873.
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL (1990) Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:1561-1565.
- Kovacs GG, Budka H (2008) Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol* 172:555-565.
- Kovacs GG, Head MW, Hegyi I, Bunn TJ, Flicker H, Hainfellner JA, McCardle L, Laszlo L, Jarius C, Ironside JW, Budka H (2002a) Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. *Brain Pathol* 12:1-11.
- Kovacs GG, Trabattoni G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RS, Budka H (2002b) Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. *J Neurol* 249:1567-1582.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO journal* 29:3020-3032.
- Kukar T, Golde TE (2008) Possible mechanisms of action of NSAIDs and related compounds that modulate gamma-secretase cleavage. *Current topics in medicinal chemistry* 8:47-53.
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Duff K, Howlett DR (2003) Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiology of disease* 14:89-97.
- Kwak YD, Brannen CL, Qu T, Kim HM, Dong X, Soba P, Majumdar A, Kaplan A, Beyreuther K, Sugaya K (2006) Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells Dev* 15:381-389.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6448-6453.
- Larson M, Sherman MA, Amar F, Nuvolone M, Schneider JA, Bennett DA, Aguzzi A, Lesne SE (2012) The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in

- Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:16857-16871a.
- Lasmezas CI (2003) Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull* 66:61-70.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457:1128-1132.
- Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, Hill AF (2005) Prion protein glycosylation. *Journal of neurochemistry* 93:793-801.
- Ledesma MD, Bonay P, Colaco C, Avila J (1994) Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry* 269:21614-21619.
- Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, Fang SM, Do LH, Andreadis A, Van Hoesen G, Ksiezak-Reding H (2004) Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:2304-2312.
- Lee KJ, Panzera A, Rogawski D, Greene LE, Eisenberg E (2007) Cellular prion protein (PrPC) protects neuronal cells from the effect of huntingtin aggregation. *J Cell Sci* 120:2663-2671.
- Lee MJ, Lee JH, Rubinsztein DC (2013) Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Progress in neurobiology* 105:49-59.
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML (2003) Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochimica et biophysica acta* 1619:167-176.
- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ (1996) Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiology of disease* 3:16-32.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.
- Lesne SE (2014) Toxic oligomer species of amyloid-beta in Alzheimer's disease, a timing issue. *Swiss Med Wkly* 144:w14021.
- Lesne SE, Sherman MA, Grant M, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA, Ashe KH (2013) Brain amyloid-beta oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* 136:1383-1398.
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977.
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248:1124-1126.
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *The EMBO journal* 26:548-558.
- Li A, Sakaguchi S, Atarashi R, Roy BC, Nakaoko R, Arima K, Okimura N, Kopacek J, Shigematsu K (2000) Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell Mol Neurobiol* 20:553-567.
- Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y (2004) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3632-3637.
- Liberski PP (2012) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Adv Exp Med Biol* 724:128-137.
- Liberski PP (2013) Kuru: A Journey Back in Time from Papua New Guinea to the Neanderthals' Extinction. *Pathogens* 2:472-505.

- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiological reviews* 88:673-728.
- Lindgren M, Hallbrink M, Prochiantz A, Langel U (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* 21:99-103.
- Lis H, Sharon N (1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218:1-27.
- Liu YH, Wei W, Yin J, Liu GP, Wang Q, Cao FY, Wang JZ (2009) Proteasome inhibition increases tau accumulation independent of phosphorylation. *Neurobiology of aging* 30:1949-1961.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Longo VD, Viola KL, Klein WL, Finch CE (2000) Reversible inactivation of superoxide-sensitive aconitase in Abeta1-42-treated neuronal cell lines. *Journal of neurochemistry* 75:1977-1985.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:7951-7955.
- Lorent K, Overbergh L, Moechars D, De Strooper B, Van Leuven F, Van den Berghe H (1995) Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* 65:1009-1025.
- Lorenzo A, Yankner BA (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12243-12247.
- Lourenco FC, Galvan V, Fombonne J, Corset V, Llambi F, Muller U, Bredesen DE, Mehlen P (2009) Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death Differ* 16:655-663.
- Lu B, Vogel H (2009) *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. *Annual review of pathology* 4:315-342.
- Lundberg P, Langel U (2003) A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* 16:227-233.
- Luo L, Tully T, White K (1992) Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *Appl* gene. *Neuron* 9:595-605.
- Luo Y, Bolon B, Damore MA, Fitzpatrick D, Liu H, Zhang J, Yan Q, Vassar R, Citron M (2003) BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiology of disease* 14:81-88.
- Llorens F, Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Zafar S, Grau-Rivera O, Lopez-Gonzalez I, Blanco R, Carmona M, Yague J, Nos C, Del Rio JA, Gelpi E, Zerr I, Ferrer I (2013a) PrP mRNA and protein expression in brain and PrP(c) in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease MM1 and VV2. *Prion* 7:383-393.
- Llorens F, Carulla P, Villa A, Torres JM, Fortes P, Ferrer I, del Rio JA (2013b) PrP(C) regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *Journal of neurochemistry* 127:124-138.
- Ma J, Wollmann R, Lindquist S (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298:1781-1785.
- Ma QH, Futagawa T, Yang WL, Jiang XD, Zeng L, Takeda Y, Xu RX, Bagnard D, Schachner M, Furley AJ, Karagogeos D, Watanabe K, Dawe GS, Xiao ZC (2008) A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10:283-294.
- Mange A, Beranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, Lehmann S (2004) Alpha- and beta-cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* 96:125-132.

- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Molecular neurobiology* 8:121-127.
- Martinez-Vicente M, Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6:352-361.
- Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Circella A, Manganelli V, Lucania G, Pavan A, Sorice M (2004) Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS letters* 560:14-18.
- May P, Boggs L, Brier R, Calligaro D, Citron M, Day T, Lin S, Lindstrom T, Mergott D, Monk S, Sanchez-Felix MV, Sheehan S, Vaught G, Yang Z, Audia J (2012) Preclinical characterization of LY2886721: A BACE1 inhibitor in clinical development for early Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 8:P95.
- May PC, Dean RA, Lowe SL, Martenyi F, Sheehan SM, Boggs LN, Monk SA, Mathes BM, Mergott DJ, Watson BM, Stout SL, Timm DE, Smith Labell E, Gonzales CR, Nakano M, Jhee SS, Yen M, Ereshefsky L, Lindstrom TD, Calligaro DO, Cocke PJ, Greg Hall D, Friedrich S, Citron M, Audia JE (2011) Robust central reduction of amyloid-beta in humans with an orally available, non-peptidic beta-secretase inhibitor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:16507-16516.
- McConlogue L, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, Games D, Johnson-Wood K, Lee M, Zeller M, Liu W, Motter R, Sinha S (2007) Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *The Journal of biological chemistry* 282:26326-26334.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy MP, Beard J, Das P, Jansen K, Delucia M, Lin WL, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J, Golde T (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 47:191-199.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- McNeill A (2004) A Molecular Analysis Of Prion Protein Expression In Alzheimer's Disease. *McGill Journal of Medicine* 8:7-14.
- Mehrpour M, Codogno P (2010) Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett* 290:1-23.
- Meyne F, Gloeckner SF, Ciesielczyk B, Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Zerr I (2009) Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 17:863-873.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:12683-12688.
- Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H, Horvat S, Manson J, Clinton M (2003) Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr* 11:1-12.
- Milletti F (2012) Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 17:850-860.
- Mills J, Reiner PB (1999) Mitogen-activated protein kinase is involved in N-methyl-D-aspartate receptor regulation of amyloid precursor protein cleavage. *Neuroscience* 94:1333-1338.

- Minami SS, Clifford TG, Hoe HS, Matsuoka Y, Rebeck GW (2012) Fyn knock-down increases Abeta, decreases phospho-tau, and worsens spatial learning in 3xTg-AD mice. *Neurobiology of aging* 33:825 e815-824.
- Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fulop L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkanen A, Tanila H (2009) Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:3453-3462.
- Mondragon-Rodriguez S, Perry G, Zhu X, Moreira PI, Acevedo-Aquino MC, Williams S (2013) Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: implications for Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013:940603.
- Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of molecular biology* 292:797-817.
- Morales R, Duran-Aniotz C, Castilla J, Estrada LD, Soto C (2012) De novo induction of amyloid-beta deposition in vivo. *Molecular psychiatry* 17:1347-1353.
- Morales R, Estrada LD, Diaz-Espinoza R, Morales-Scheihing D, Jara MC, Castilla J, Soto C (2010) Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:4528-4535.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925-1928.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:4050-4058.
- Muhs A, Hickman DT, Pihlgren M, Chuard N, Giriens V, Meerschman C, van der Auwera I, van Leuven F, Sugawara M, Weingertner MC, Bechinger B, Greferath R, Kolonko N, Nagel-Steger L, Riesner D, Brady RO, Pfeifer A, Nicolau C (2007) Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:9810-9815.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347.
- Muller UC, Zheng H (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006288.
- Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N, Younkin SG, Cruchaga C, Kauwe JS, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huentelman MJ, Myers AJ, Barmada MM, Demirci FY, Baldwin CT, Green RC, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Arnold SE, Barber R, Beach T, Bigio EH, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Cairns NJ, Carlson CS, Carney RM, Carroll SL, Chui HC, Clark DG, Corneveaux J, Cotman CW, Cummings JL, DeCarli C, DeKosky ST, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson DW, Ellis WG, Faber KM, Fallon KB, Farlow MR, Ferris S, Frosch MP, Galasko DR,

- Ganguli M, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Gilman S, Giordani B, Glass JD, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Head E, Honig LS, Hulette CM, Hyman BT, Jicha GA, Jin LW, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Koo EH, Kowall NW, Lah JJ, Levey AI, Lieberman AP, Lopez OL, Mack WJ, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Parisi JE, Perl DP, Peskind E, Petersen RC, Poon WW, Quinn JF, Rajbhandary RA, Raskind M, Reisberg B, Ringman JM, Roberson ED, Rosenberg RN, Sano M, Schneider LS, Seeley W, Shelanski ML, Slifer MA, Smith CD, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Williamson J, Woltjer RL, Cantwell LB, Dombroski BA, Beekly D, Lunetta KL, Martin ER, Kamboh MI, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Hakonarson H, Kukull WA, Foroud TM, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Schellenberg GD (2011) Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:436-441.
- Nalivaeva NN, Turner AJ (2013) The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS letters* 587:2046-2054.
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:3659-3668.
- Nicolas O, Gavin R, del Rio JA (2009) New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res Rev* 61:170-184.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9:448-452.
- Nieznanski K, Choi JK, Chen S, Surewicz K, Surewicz WK (2012) Soluble prion protein inhibits amyloid-beta (A β) fibrillization and toxicity. *The Journal of biological chemistry* 287:33104-33108.
- Nixon RA (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 120:4081-4091.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:113-122.
- Nunan J, Small DH (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS letters* 483:6-10.
- Nuvolone M, Kana V, Hutter G, Sakata D, Mortin-Toth SM, Russo G, Danska JS, Aguzzi A (2013) SIRPalpha polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine* 210:2539-2552.
- O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience* 34:185-204.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:10129-10140.
- Octave JN, Pierrot N, Ferao Santos S, Nalivaeva NN, Turner AJ (2013) From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein. *Journal of neurochemistry* 126:183-190.
- Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF, et al. (1995) Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A β 1-42) and forms slowly sedimenting A β complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 136:22-31.

- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.
- Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, Kinoshita T, Goto Y, Kimura H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K (2003) Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan. *Ann Neurol* 54:553-554; author reply 555.
- Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF (2004) BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 41:27-33.
- Ordonez-Gutierrez L, Torres JM, Gavin R, Anton M, Arroba-Espinosa AI, Espinosa JC, Vergara C, Del Rio JA, Wandosell F (2013) Cellular prion protein modulates beta-amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of aging* 34:2793-2804.
- Ostapchenko VG, Beraldo FH, Guimaraes AL, Mishra S, Guzman M, Fan J, Martins VR, Prado VF, Prado MA (2013) Increased prion protein processing and expression of metabotropic glutamate receptor 1 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 127:415-425.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L (2007) Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55:697-711.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:10962-10966.
- Pantera B, Bini C, Cirri P, Paoli P, Camici G, Manao G, Caselli A (2009) PrPc activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells: role for caveolin-1 in the signal transduction pathway. *Journal of neurochemistry* 110:194-207.
- Park JH, Gimbel DA, GrandPre T, Lee JK, Kim JE, Li W, Lee DH, Strittmatter SM (2006) Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:1386-1395.
- Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM (2007) Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11062-11067.
- Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I (2013) Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 24:358-369.
- Paulson JC (1989) Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* 14:272-276.
- Pereira GS, Walz R, Bonan CD, Battastini AM, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR, Sarkis JJ (2001) Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. *Neurosci Lett* 301:72-74.
- Perera WS, Hooper NM (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Current biology : CB* 11:519-523.
- Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH (1999) Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *The Journal of biological chemistry* 274:18851-18856.
- Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162:703-717.

- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 118:2190-2199.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:1676-1687.
- Pimplikar SW (2009) Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41:1261-1268.
- Poppek D, Keck S, Ermak G, Jung T, Stolzing A, Ullrich O, Davies KJ, Grune T (2006) Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochem J* 400:511-520.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464.
- Pradines E, Hernandez-Rapp J, Villa-Diaz A, Dakowski C, Ardila-Osorio H, Haik S, Schneider B, Launay JM, Kellermann O, Torres JM, Mouillet-Richard S (2013) Pathogenic prions deviate PrP(C) signaling in neuronal cells and impair A-beta clearance. *Cell death & disease* 4:e456.
- Pride M, Seubert P, Grundman M, Hagen M, Eldridge J, Black RS (2008) Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis* 5:194-196.
- Probst G, Xu YZ (2012) Small-molecule BACE1 inhibitors: a patent literature review (2006 - 2011). *Expert opinion on therapeutic patents* 22:511-540.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
- Prusiner SB (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13363-13383.
- Prusiner SB, Cochran SP, Downey DE, Groth DF (1981) Determination of scrapie agent titer from incubation period measurements in hamsters. *Adv Exp Med Biol* 134:385-399.
- Prusiner SB, Cochran SP, Groth DF, Downey DE, Bowman KA, Martinez HM (1982) Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol* 11:353-358.
- Pujals S, Giralt E (2008) Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 60:473-484.
- Pulido XC (2014) Péptidos miméticos con capacidad de atravesar barreras biológicas. p 207.
- PwC (2013) El estado del arte de la enfermedad de Alzheimer en España.
- Rajapaksha TW, Eimer WA, Bozza TC, Vassar R (2011) The Alzheimer's beta-secretase enzyme BACE1 is required for accurate axon guidance of olfactory sensory neurons and normal glomerulus formation in the olfactory bulb. *Mol Neurodegener* 6:88.
- Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007) Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *Journal of neuroscience research* 85:2741-2755.
- Rangel A, Madronal N, Gruart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-Garcia JM, Del Rio JA (2009) Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS one* 4:e7592.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:6364-6369.
- Reed MN, Hofmeister JJ, Jungbauer L, Welzel AT, Yu C, Sherman MA, Lesne S, LaDu MJ, Walsh DM, Ashe KH, Cleary JP (2011) Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived Abeta oligomers. *Neurobiology of aging* 32:1784-1794.

- Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, Triller A (2010) Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66:739-754.
- Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Muller V, Krishnan R, Vabulas RM, Kretzschmar HA, Lindquist S, Hartl FU, Multhaup G, Winklhofer KF, Tatzelt J (2011) The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *The EMBO journal* 30:2057-2070.
- Richter-Landsberg C (2007) Heat Shock Proteins: Expression and functional roles in nerve cells and glia. In: Richter-Landsberg, C. Ed, *Heat Shock Proteins in neural cells*. New York, Landes Bioscience 12.
- Riesner D (2004) Transmissible spongiform encephalopathies: the prion theory--background and basic information. *Contrib Microbiol* 11:1-13.
- Riesner D, Kellings K, Wiese U, Wulfert M, Mirenda C, Prusiner SB (1993) Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev Biol Stand* 80:173-181.
- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu GQ, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L (2011) Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:700-711.
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T (1994) Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:7450-7454.
- Rodgers AB (2011) *Alzheimer's Disease: Unraveling the Mystery*.
- Rodrigue KM, Rieck JR, Kennedy KM, Devous MD, Sr., Diaz-Arrastia R, Park DC (2013) Risk factors for beta-amyloid deposition in healthy aging: vascular and genetic effects. *JAMA neurology* 70:600-606.
- Rodriguez-Martin T, Cuchillo-Ibanez I, Noble W, Nyenya F, Anderton BH, Hanger DP (2013) Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiology of aging* 34:2146-2157.
- Roesler R, Walz R, Quevedo J, de-Paris F, Zanata SM, Graner E, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (1999) Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain research Molecular brain research* 71:349-353.
- Rosenmann H, Grigoriadis N, Karussis D, Boimel M, Touloumi O, Ovadia H, Abramsky O (2006) Tauopathy-like abnormalities and neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. *Archives of neurology* 63:1459-1467.
- Rossner S, Beck M, Stahl T, Mendla K, Schliebs R, Bigl V (2000) Constitutive overactivation of protein kinase C in guinea pig brain increases alpha-secretory APP processing without decreasing beta-amyloid generation. *The European journal of neuroscience* 12:3191-3200.
- Roucou X, Gains M, LeBlanc AC (2004) Neuroprotective functions of prion protein. *Journal of neuroscience research* 75:153-161.
- Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC (2003) Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *The Journal of biological chemistry* 278:40877-40881.
- Roychaudhuri R, Yang M, Hoshi MM, Teplow DB (2009) Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 284:4749-4753.
- Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA (2002) Glycosylation and prion protein. *Curr Opin Struct Biol* 12:578-586.

- Rushworth JV, Griffiths HH, Watt NT, Hooper NM (2013) Prion protein-mediated toxicity of amyloid-beta oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. *The Journal of biological chemistry* 288:8935-8951.
- Ryan JM, Grundman M (2009) Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: ACC-001 clinical trials are ongoing. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 17:243.
- Sadler K, Eom KD, Yang JL, Dimitrova Y, Tam JP (2002) Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7. *Biochemistry* 41:14150-14157.
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4:1157-1165.
- Saijo E, Scheff SW, Telling GC (2011) Unaltered prion protein expression in Alzheimer disease patients. *Prion* 5:109-116.
- Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *The European journal of neuroscience* 10:2464-2471.
- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169:341-354.
- Saraceno C, Musardo S, Marcello E, Pelucchi S, Luca MD (2013) Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Frontiers in pharmacology* 4:77.
- Sarnataro D, Paladino S, Campana V, Grassi J, Nitsch L, Zurzolo C (2002) PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3:810-821.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:9649-9653.
- Schmitz M, Wulf K, Signore SC, Schulz-Schaeffer WJ, Kermer P, Bahr M, Wouters FS, Zafar S, Zerr I (2014) Impact of the cellular prion protein on amyloid-beta and 3PO-tau processing. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 38:551-565.
- Schneeberger A, Mandler M, Otawa O, Zauner W, Mattner F, Schmidt W (2009) Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)--from concept to clinical testing. *J Nutr Health Aging* 13:264-267.
- Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O (2003) NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:13326-13331.
- Schwarze-Eicker K, Keyvani K, Gortz N, Westaway D, Sachser N, Paulus W (2005) Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiology of aging* 26:1177-1182.
- Selkoe DJ (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8:447-453.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews* 81:741-766.
- Selvaraj V, Soundarapandian MM, Chechneva O, Williams AJ, Sidorov MK, Soulika AM, Pleasure DE, Deng W (2009) PARP-1 deficiency increases the severity of disease in a mouse model of multiple sclerosis. *The Journal of biological chemistry* 284:26070-26084.
- Serneels L, Van Biervliet J, Craessaerts K, DeJaegere T, Horre K, Van Houtvin T, Esselmann H, Paul S, Schafer MK, Berezovska O, Hyman BT, Sprangers B, Sciot R, Moons L, Jucker M, Yang Z, May PC, Karran E, Wiltfang J, D'Hooge R, De Strooper B (2009) gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* 324:639-642.

- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006189.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.
- Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S (1997) Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89:629-639.
- Sheng J, Oyler G, Zhou B, Janda K, Shoemaker CB (2009) Identification and characterization of a novel cell-penetrating peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 382:236-240.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.
- Shi Q, Jing YY, Wang SB, Chen C, Sun H, Xu Y, Gao C, Zhang J, Tian C, Guo Y, Ren K, Dong XP (2013) PrP octarepeats region determined the interaction with caveolin-1 and phosphorylation of caveolin-1 and Fyn. *Medical microbiology and immunology* 202:215-227.
- Shirazi SK, Wood JG (1993) The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport* 4:435-437.
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93:203-214.
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 268:15922-15928.
- Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, Frangione B, Wisniewski T (2001) Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am J Pathol* 159:439-447.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
- Sisodia SS (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:6075-6079.
- Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL (1993) Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:3136-3142.
- Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, Doms RW, Lee VM (2000) Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *The Journal of biological chemistry* 275:2568-2575.
- Snowdon DA, Kemper SJ, Mortimer JA, Greiner LH, Wekstein DR, Markesbery WR (1996) Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life. Findings from the Nun Study. *Jama* 275:528-532.
- Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E (1997) Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4109-4112.

- Spielhauer C, Schatzl HM (2001) PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 276:44604-44612.
- Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS one* 5:e9979.
- Spillantini MG, Goedert M (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12:609-622.
- Spires-Jones TL, de Calignon A, Matsui T, Zehr C, Pitsstick R, Wu HY, Osetek JD, Jones PB, Bacskai BJ, Feany MB, Carlson GA, Ashe KH, Lewis J, Hyman BT (2008) In vivo imaging reveals dissociation between caspase activation and acute neuronal death in tangle-bearing neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:862-867.
- Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, Bacskai BJ, Hyman BT (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:7278-7287.
- St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, et al. (1987) The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235:885-890.
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51:229-240.
- Steele AD, Zhou Z, Jackson WS, Zhu C, Auluck P, Moskowitz MA, Chesselet MF, Lindquist S (2009) Context dependent neuroprotective properties of prion protein (PrP). *Prion* 3:240-249.
- Stewart RS, Harris DA (2003) Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection. *The Journal of biological chemistry* 278:45960-45968.
- Stine WB, Jr., Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *The Journal of biological chemistry* 278:11612-11622.
- Stockley JH, O'Neill C (2007) The proteins BACE1 and BACE2 and beta-secretase activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Biochem Soc Trans* 35:574-576.
- Stokin GB, Goldstein LS (2006) Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* 75:607-627.
- Storey E, Spurck T, Pickett-Heaps J, Beyreuther K, Masters CL (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites. *Brain research* 735:59-66.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:1977-1981.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13287-13292.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *The EMBO journal* 22:3591-3601.
- Takahashi RH, Tobiume M, Sato Y, Sata T, Gouras GK, Takahashi H (2011) Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 31:208-214.

- Tamagno E, Bardini P, Guglielmotto M, Danni O, Tabaton M (2006) The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free radical biology & medicine* 41:202-212.
- Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB (1992) Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* 3:851-863.
- Taylor DR, Hooper NM (2006) The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol* 23:89-99.
- Terry RD (1996) The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1023-1025.
- Terwel D, Dewachter I, Van Leuven F (2002) Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine* 2:151-165.
- Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry* 283:29615-29619.
- Thonberg H, Fallstrom M, Bjorkstrom J, Schoumans J, Nennesmo I, Graff C (2011) Mutation screening of patients with Alzheimer disease identifies APP locus duplication in a Swedish patient. *BMC Res Notes* 4:476.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *The Journal of physiology* 572:477-492.
- Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C, Prusiner SB, DeArmond SJ (2007) Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain research* 1139:60-67.
- Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* 6:1887-1902.
- Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O (2004) Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 55:801-814.
- Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* 25:412-417.
- Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM (2012) Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15:1227-1235.
- Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP (2003) Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *The European journal of neuroscience* 17:388-396.
- Vanier MT, Neuville P, Michalik L, Launay JF (1998) Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1419-1432.
- Vassallo N, Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *Journal of neurochemistry* 86:538-544.
- Vassar R (2014) BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy* 6:89.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Vega IE, Cui L, Propst JA, Hutton ML, Lee G, Yen SH (2005) Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Brain research Molecular brain research* 138:135-144.
- Velayos JL, Irujo A, Cuadrado-Tejedor M, Paternain B, Moleres FJ, Ferrer V (2009) The cellular prion protein and its role in Alzheimer disease. *Prion* 3:110-117.

- Vergara C, Ordonez-Gutierrez L, Wandosell F, Ferrer I, Del Rio JA, Gavin R (2014) Role of PrP Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution. *Molecular neurobiology*.
- Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14945-14949.
- Vincent B, Paitel E, Frobert Y, Lehmann S, Grassi J, Checler F (2000) Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *The Journal of biological chemistry* 275:35612-35616.
- Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, De Strooper B, Grassi J, Lopez-Perez E, Checler F (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *The Journal of biological chemistry* 276:37743-37746.
- Vives E, Brodin P, Lebleu B (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of biological chemistry* 272:16010-16017.
- Vlieghe P, Khrestchatsky M (2010) Peptide-based vectors for blood-brain barrier targeting and delivery of drugs to the central nervous system. *Ther Deliv* 1:489-494.
- von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435-4448.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein and peptide letters* 11:213-228.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of neurochemistry* 101:1172-1184.
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ (2000) The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 39:10831-10839.
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40:1679-1682.
- Wang DS, Dickson DW, Malter JS (2006) beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2006:58406.
- Wang H, Ren CH, Gunawardana CG, Schmitt-Ulms G (2013a) Overcoming barriers and thresholds - signaling of oligomeric Abeta through the prion protein to Fyn. *Mol Neurodegener* 8:24.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R (2013b) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153:910-918.
- Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL (2002) Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain research* 924:133-140.
- Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R (2004) Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:3370-3378.

- Wang R, Meschia JF, Cotter RJ, Sisodia SS (1991) Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 266:16960-16964.
- Wang X, Dong CF, Shi Q, Shi S, Wang GR, Lei YJ, Xu K, An R, Chen JM, Jiang HY, Tian C, Gao C, Zhao YJ, Han J, Dong XP (2009) Cytosolic prion protein induces apoptosis in human neuronal cell SH-SY5Y via mitochondrial disruption pathway. *BMB Rep* 42:444-449.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.
- Watts JC, Westaway D (2007) The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochimica et biophysica acta* 1772:654-672.
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bahr M (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37:1296-1300.
- Weissmann C (1991) Spongiform encephalopathies. The prion's progress. *Nature* 349:569-571.
- Weissmann C, Flechsig E (2003) PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* 66:43-60.
- Wentzell J, Kretzschmar D (2010) Alzheimer's disease and tauopathy studies in flies and worms. *Neurobiology of disease* 40:21-28.
- Westaway D, Daude N, Wohlgemuth S, Harrison P (2011) The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. *Top Curr Chem* 305:225-256.
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochimica et biophysica acta* 1772:629-644.
- Whitehouse IJ, Jackson C, Turner AJ, Hooper NM (2010) Prion protein is reduced in aging and in sporadic but not in familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 22:1023-1031.

- Whitehouse IJ, Miners JS, Glennon EB, Kehoe PG, Love S, Kellett KA, Hooper NM (2013) Prion protein is decreased in Alzheimer's brain and inversely correlates with BACE1 activity, amyloid-beta levels and Braak stage. *PloS one* 8:e59554.
- Wilson DR, Anderson RD, Smith W (1950) Studies in scrapie. *J Comp Pathol* 60:267-282.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921-925.
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314:664-666.
- Williamson R, Usardi A, Hanger DP, Anderton BH (2008) Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB J* 22:1552-1559.
- Winblad B, Andreasen N, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, Maguire RP, Blennow K, Lundmark J, Staufenbiel M, Orgogozo JM, Graf A (2012) Safety, tolerability, and antibody response of active Abeta immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol* 11:597-604.
- Winkler DT, Biedermann L, Tolnay M, Allegrini PR, Staufenbiel M, Wiessner C, Jucker M (2002) Thrombolysis induces cerebral hemorrhage in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 51:790-793.
- Wirak DO, Bayney R, Ramabhadran TV, Fracasso RP, Hart JT, Hauer PE, Hsiao P, Pekar SK, Scangos GA, Trapp BD, et al. (1991) Deposits of amyloid beta protein in the central nervous system of transgenic mice. *Science* 253:323-325.
- Wisniewski T, Goni F (2014) Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 88:499-507.
- Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, Tan RP, Clark IA, Abdipranoto A, Vissel B (2013) Neuroinflammation and neuronal loss precede Abeta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* 8:e59586.
- Yamazaki M, Oyanagi K, Mori O, Kitamura S, Ohyama M, Terashi A, Kitamoto T, Katayama Y (1999) Variant Gerstmann-Straussler syndrome with the P105L prion gene mutation: an unusual case with nigral degeneration and widespread neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathol* 98:506-511.
- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ (1997) Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:1004-1010.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Henrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533-537.
- Yan R, Vassar R (2014) Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol* 13:319-329.
- Yan Y, Wang C (2006) Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity. *Journal of molecular biology* 364:853-862.
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, Li R, Shen Y (2003) Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9:3-4.
- Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG (2013) Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord* 6:19-33.
- Younan ND, Sarell CJ, Davies P, Brown DR, Viles JH (2013) The cellular prion protein traps Alzheimer's Abeta in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. *FASEB J* 27:1847-1858.

- Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ (2007) A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:14459-14469.
- Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang DM, Xu DH, Sato C, Rogaev E, Smith M, Janus C, Zhang Y, Aebersold R, Farrer LS, Sorbi S, Bruni A, Fraser P, St George-Hyslop P (2000) Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407:48-54.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171:87-98.
- Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, Cuervo AM, Nixon RA (2004) Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36:2531-2540.
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:145-150.
- Zars T, Wolf R, Davis R, Heisenberg M (2000) Tissue-specific expression of a type I adenylyl cyclase rescues the rutabaga mutant memory defect: in search of the engram. *Learn Mem* 7:18-31.
- Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2010) Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:11938-11950.
- Zhang S, Xu Y, Wang B, Qiao W, Liu D, Li Z (2004) Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release* 100:165-180.
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, Stevens KA, Slunt HH, Sisoda SS, Chen HY, Van der Ploeg LH (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81:525-531.
- Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1:5.
- Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6:27.

ANEXO 1

INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO

Por la presente, hago constar el *Factor de Impacto* correspondiente a las revistas donde se han publicado los artículos científicos que conforman la Tesis Doctoral presentada por Cristina Vergara Paños.

- ✓ Neurobiology of Aging: 6.166
- ✓ Molecular Neurobiology: 5.286

Director i tutor de la tesis

Dr. José Antonio del Río
Fernández

Codirector de la tesis

Dr. Rosalina Gavín Marín

ANEXO II

INFORME DE PARTICIPACIÓN

El Dr. José Antonio del Río Fernández y la Dra. Rosalina Gavín Marín, director y codirectora respectivamente de la Tesis doctoral “Papel regulador de la proteína priónica celular en la enfermedad de Alzheimer y uso de gamma-péptidos como potenciales agentes terapéuticos”, realizada por la doctoranda Cristina Vergara Paños, informan que la participación de la doctoranda en los artículos científicos que conforman la presente tesis ha sido la siguiente:

En el artículo “Cellular prion protein modulates β -amyloid deposition in aged APP/PS1 transgenic mice”, publicado en la revista *Neurobiology of Aging*, la doctoranda ha participado en la realización de los experimentos en colaboración con el laboratorio del Dr. Francisco Wandosell.

En el artículo “Role of PrP^C Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution”, publicado en la revista *Molecular Neurobiology*, la doctoranda ha participado en el diseño de los experimentos y es la principal responsable del desarrollo de los mismos.

Por último hago constar que ninguno de estos artículos ha sido utilizado en la elaboración de otras tesis doctorales.

Director i tutor de la tesis

Dr. José Antonio del Río
Fernández

Codirector de la tesis

Dr. Rosalina Gavín Marín

