



Departament de Farmacologia, Toxicologia i
Terapèutica
Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina

Accions no canòniques dels
anticolíneràtics huprínes:
efectes sobre l'agregació
amiloïdogènica i la
neuroprotecció



Marta Pera Muñoz
2010



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Farmacologia, Toxicologia i Terapèutica
Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina

**Accions no canòniques dels
anticolinesteràsics huprines: efectes
sobre l'agregació amiloidogènica i la
neuroprotecció**

Marta Pera Muñoz

TESI DOCTORAL

Bellaterra 2010



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Farmacologia, Toxicologia i Terapèutica
Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina

**Accions no canòniques dels
anticolinesteràsics huprines: efectes
sobre l'agregació amiloidogènica i la
neuroprotecció**

Memoria de tesi doctoral presentada per Marta Pera Muñoz per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat a la Unitat de Farmacologia de la Facultat de Medicina del Departament de Farmacologia, Toxicologia i Terapèutica de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció de la Doctora Victoria Clos Guillén i el Doctor Albert Badia Sancho.

Projecte subvencionat per la *Dirección General de Investigación Científica y Técnica* (DGICYT). Amb el suport del *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte*.

Bellaterra, Data 5 Març 2010

Doctoranda

Director de la tesi

Director de la tesi

Marta Pera Muñoz Dra. Victoria Clos Guillén Dr. Albert Badia Sancho

I. ABREVIATURES.....	1
II. RESUM	3
III. INTRODUCCIÓ	7
<u>1. PROTEÏNES I PÈPTIDS AMILOIDES. CARACTERÍSTIQUES</u>	7
<u>1.1 Malaltia d'Alzheimer. Proteïna precursora d'amiloide i βA</u>	7
1.1.1 Característiques generals de la MA	9
1.1.2 Alteracions neuropatològiques	9
1.1.3 Importància de les plaques senils: la proteïna β -amiloide	11
1.1.4 Model d'agregació del pèptid β A	12
1.1.5 La hipòtesi de la cascada de l'amiloide.....	14
<u>1.2 Encefalopaties espongiformes transmissibles. Prions</u>	15
1.2.1 Característiques generals de les EET.....	15
1.2.2 Prions	17
1.2.3 Estructura i propietats de Prp ^C i Prp ^{SC}	19
1.2.4 Models de conversió de PrP ^C en PrP ^{SC}	21
<u>2. NEURODEGENERACIÓ PATOLÒGICA I ESTRÈS OXIDATIU</u>	24
<u>2.1 Neurodegeneració patològica i estrès oxidatiu</u>	24
2.1.1 Mecanismes de la mort cel·lular en neurones.....	25
2.1.2 Relació entre diferents tipus de mort cel·lular	27
<u>2.2 Estrès oxidatiu en les malalties neurodegeneratives</u>	28
2.2.1 Estrès oxidatiu en l'etiologia i la patofisiologia de la MA	30
2.2.2 Mecanismes antioxidants	32
<u>3. SISTEMA COLINÈRGIC I MALALTIA D'ALZHEIMER</u>	34
<u>3.1 Els receptors muscarínics</u>	35
<u>3.2 Els receptors nicotínics</u>	37
<u>3.3 Colinesterases</u>	40
<u>3.4 Relació de l'AChE amb les proteïnes amiloides</u>	44

<u>4. FÀRMACS INHIBIDORS DE L'ACETILCOLINESTERASA</u>	47
<u>4.1 Anticolinesteràsics principals utilitzats en el tractament de la MA</u>	47
<u>4.2 Evidències dels efectes neuroprotectors dels inhibidors de l'ACHÉ</u>	52
<u>4.3 Fàrmacs híbrids tacrina-huperzina A</u>	54
 IV. OBJECTIUS.....	61
 V. MATERIAL I MÈTODES.....	65
 <u>1. MATERIAL I REACTIUS</u>	65
<u>1.1 Animals d'experimentació</u>	65
<u>1.2 Reactius</u>	65
 <u>2. MÈTODES</u>	67
<u>2.1 Estudi de l'amiloidogènesi espontània i induïda per AChE dels pèptids prionics PrP106-126 i PrP82-146</u>	67
2.1.1 PrP106-126 i PrP82-146	67
2.1.2 Liofilització dels pèptids prionics.....	67
2.1.3 Agregació dels pèptids induïda per AChE. Estudi amb IACHÉ	67
2.1.4 Microscòpia de fluorescència i anàlisi d'imatges.....	70
2.1.5 Tinció amb vermell Congo i birefringència.....	70
2.1.6 Microscòpia electrònica	70
2.1.7 Microscòpia de força atòmica	71
2.1.8 Càlculs.....	73
 <u>2.2 Estudi de l'efecte antiagregant i anàlisi del perfil colinèrgic dels heterodímers huprina-tacrina Hup8TCI i Hup8TH</u>	74
2.2.1 Efecte sobre el procés d'amiloidogènesi de PrP102-126.....	74
2.2.2 Determinació de l'activitat anticolinesteràsica <i>in vitro</i>	74
2.2.3 Estudis de fixació de radiolligands als receptors muscarínics.....	76
 <u>2.3 Estudis de neuroprotecció en cèl·lules PC12</u>	81
2.3.1 Cultiu cel·lular i tractament experimental.....	81
2.3.2 Assaig de determinació de la viabilitat cel·lular.....	83
2.3.3 Assaig per a la determinació de l'activitat de la SOD.....	84
2.3.4 Càlculs	85

<u>3. ANÀLISI ESTADÍSTICA</u>	86
<u>VI. RESULTATS</u>	89
<u>1. ESTUDIS D'AGREGACIÓ</u>	89
<u>1.1 Agregació del pèptid PrP106-126</u>	89
1.1.1 Cinètica d'agregació de PrP106-126.....	89
1.1.2 Efecte de la concentració d'AChE en el procés d'agregació PrP106-126	90
1.1.3 Estudis d'inhibició de l'agregació de PrP106-126 induïda per AChE ..	92
1.1.4 Estudis de l'estructura amiloide dels agregats de PrP106-126: tinció vermell Congo i anàlisi per microscòpia electrònica.....	94
<u>1.2 Agregació del pèptid PrP82-146</u>	96
1.2.1 Efecte de l'AChE en el procés d'agregació de PrP82-146	96
1.2.2 Anàlisi estructural dels agregats de PrP82-146.....	99
<u>2 ESTUDI DE L'EFECTE ANTIAGREGANT I ANÀLISI DEL PERFIL COLINÈRGIC DELS HETERODÍMERS HUPRINA-TACRINA Hup8TCI i Hup8TH</u>	104
<u>2.1 Estudis d'inhibició de l'agregació de PrP106-126 amb Hup8TCI i Hup8TH.</u>	104
<u>2.2 Determinació de l'activitat anticolinesteràsica <i>in vitro</i></u>	106
<u>2.3 Estudis de fixació de radiolligands als receptors muscarínics</u>	108
2.3.1 Estudis de fixació de radiolligands als receptors muscarínics M1	108
2.3.2 Estudis de fixació de radiolligands als receptors muscarínics M2....	110
<u>3. ESTUDIS DE NEUROPROTECCIÓ</u>	113
<u>3.1 Supervivència cel·lular</u>	113
3.1.1 Cèl·lules PC12	113
3.1.2 Cèl·lules PC12 diferenciades.....	117
<u>3.2 Determinació de l'activitat superòxid dismutasa</u>	120
3.2.1 Cèl·lules PC12.....	120
3.2.2 Cèl·lules PC12 diferenciades	122

VII. DISCUSSIÓ	127
VIII. CONCLUSIONS	157
IX. BIBLIOGRAFIA.....	161
X. ANNEX.....	195

4-HNE: 4-hidroxi-2-transnonenal
ACD: mort cel·lular autofàgica
ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterasa
AFM: microscopi de força atòmica
APP: proteïna precursora de l'amiloide
ATP: adenosinatrifosfat
ASCh: acetiltiocolina
BACE: β -secretasa
 β A: pèptid β amiloide
BCh: butirilcolina
BChE: butirilcolinesterasa
Bmax: fixació màxima
BSCh: butiriltiocolina
BSE: encefalopatia espongiforme bovina
CAT: catalasa
CJD: malatia de Creutzfeldt-Jakob
ChE: colinesterasa
CE50: concentració eficaç 50
CI50: concentració inhibidora 50
DHEA: dehidroepiandrosterona
DNA: àcid desoxiribonucleic
DTNB: àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic)
EET: encefalopaties espongiformes transmissibles
Gpx: glutatió peroxidasa
Grx: glutaredoxin
GSH: glutatió
[H³]-QNB: l-quinuclidinil[fenil-4-³H]benzilal
IACHe: inhibidors de l'acetilcolinesterasa
Iso-OMPA: tetraisopropilo pirofosforamida
KD: constant de dissociació

K_i: constant d'inhibició
K_m: constant de Michaelis
LTP: potenciació de llarg termini
MA: malaltia d'Alzheimer
mAChR: receptors muscarínics
MAPK: MAP quinases
MP: malaltia de Parkinson
MRI: *magnetic resonance imaging*
MRS: proton magnetic resonance spectroscopy
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromur
nAChR: receptors nicotínics
NGF: factor de creixement neural
n_H: coeficient de Hill
NMDA: àcid-N-metil-D-aspàrtic
PET: positron emission tomography
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa
Prnp: gen que codifica per la proteïna priònica
PrP: proteïna priònica
PrP^C: proteïna priònica cè·l·lular
PrP^{Sc}: proteïna priònica patològica
PrP^{*}: proteïna priònica parcialment desnaturalitzada
Prx: peroxidoxines
RNA: àcid ribonucleic
RE: reticle endoplasmàtic
RNS: espècies reactives del nitrogen
ROS: espècies reactives de l'oxigen
SNC: sistema nerviós central
SOD: superòxid dismutasa
TBARS: substàncies àcidoreactives tiobarbitúriques
Trx: tioredoxina
XO: xantina oxidasa

El concepte de malalties neurodegeneratives agrupa un conjunt de malalties que ataquen el sistema nerviós de l'ésser humà deteriorant de manera progressiva les seves funcions motores i/o cognitives. Entre les més conegudes trobem la malaltia d'Alzheimer (MA), les encefalopaties espongiformes transmissibles (EET), la malaltia de Parkinson (MP) i la malaltia per cossos de Lewy. Clínicament hi ha una gran variabilitat de malalties, però estudis recents indiquen que poden presentar causes i mecanismes comuns. Entre altres, fibril·lació, agregació i acumulació de proteïnes en el cervell que condueixen a la mort neuronal (Dobson, 2004; Soto, 2003).

En aquestes malalties determinades proteïnes poden canviar el seu plegament cap a una conformació alternativa i estable. En la majoria dels casos, aquest canvi de conformació acaba amb l'acumulació de proteïnes erròniament plegades en forma de dipòsits fibril·lars amiloides que condueixen a una degeneració del sistema nerviós central. En funció del tipus de demència, els dipòsits proteics poden ser nuclears, citoplasmàtics o extracel·lulars.

El concepte d'amiloide va ser definit per primera vegada per Rudolph Virchow l'any 1984 com a dipòsits de filaments extracel·lulars microscòpics els quals en determinades circumstàncies poden arribar a ser macroscòpics. En els darrers anys, els avenços metodològics han donat a conèixer la naturalesa proteica de les fibres amiloides, la seva riquesa en fulla plegada β i la seva insolubilitat en tampons aquosos.

En cervells de pacients amb MA i en alguns models animals d'amiloïdosi cerebral s'ha demostrat que la pèrdua d'espines dendrítiques acompanya la patologia amiloide i que, sense cap mena de dubte, contribueix al deteriorament cognitiu que acompanya aquesta malaltia (Spire-Jones et al., 2007).

El pèptid β -amiloide, que s'acumula i agrega en el cas de la MA, en forma soluble no és neurotòxic però té tendència a agregar formant oligòmers, protofibril·les i fibres neurotòxiques. Paral·lelament, la toxicitat de les diferents espècies de β A ha estat relacionada amb l'estrès oxidatiu i, en conseqüència, amb la formació de danys oxidatius en proteïnes, lípids i àcids nucleics (Miranda et al., 2000).

L'eficàcia dels inhibidors de l'acetilcolinesterasa (IACHe) en MA lleu i moderada ha estat àmpliament demostrada; tanmateix, hi ha discrepàncies en els casos de tipus moderat-sever (Feldman, 2001). Malgrat que l'ús dels IACHe en la teràpia farmacològica de la MA només han suposat un avenç relatiu, ja que els seus beneficis són transitoris, l'eficàcia del tractament amb aquests compostos sembla que no està únicament relacionada amb la seva capacitat d'inhibir l'acetilcolinesterasa (AChE) (Narahashi et al., 2003).

L'eficàcia parcial d'aquestes teràpies ha fet que, actualment, la recerca de nous IACHe no es basi només en la seva capacitat anticolinesteràsica sinó també en altres aspectes no canònics d'aquests fàrmacs: en primer lloc, l'activitat al·lostèrica sobre els receptors nicotínics; en segon lloc, la capacitat de bloquejar el lloc perifèric de l'AChE que intervé en l'agregació del pèptid β -amiloide i, finalment, l'activitat neuroprotectora. Compostos que compreguessin aquestes quatre activitats suposarien un tractament molt més acurat per malalties complexes i multifactorials, con la MA i altres malalties neurodegeneratives.



LES EDATS DE LA VIDA Gustav Klimt

INTRODUCCIÓ

1. PROTEÏNES I PÈPTIDS AMILOIDES. CARACTERÍSTIQUES

La paraula *amiloide* va ser utilitzada per primera vegada l'any 1854 pel metge Alemany Rudolph Virchow. El 1859, Nicholas Friedrich i August Kekulé van demostrar que el component majoritari d'aquesta substància amiloide era la proteïna. Finalment, l'any 1908 Hanssen va demostrar que els dipòsits amiloides es podien digerir amb pepsina; per tant, va quedar demostrada la seva naturalesa proteica (Marsh et al., 1976).

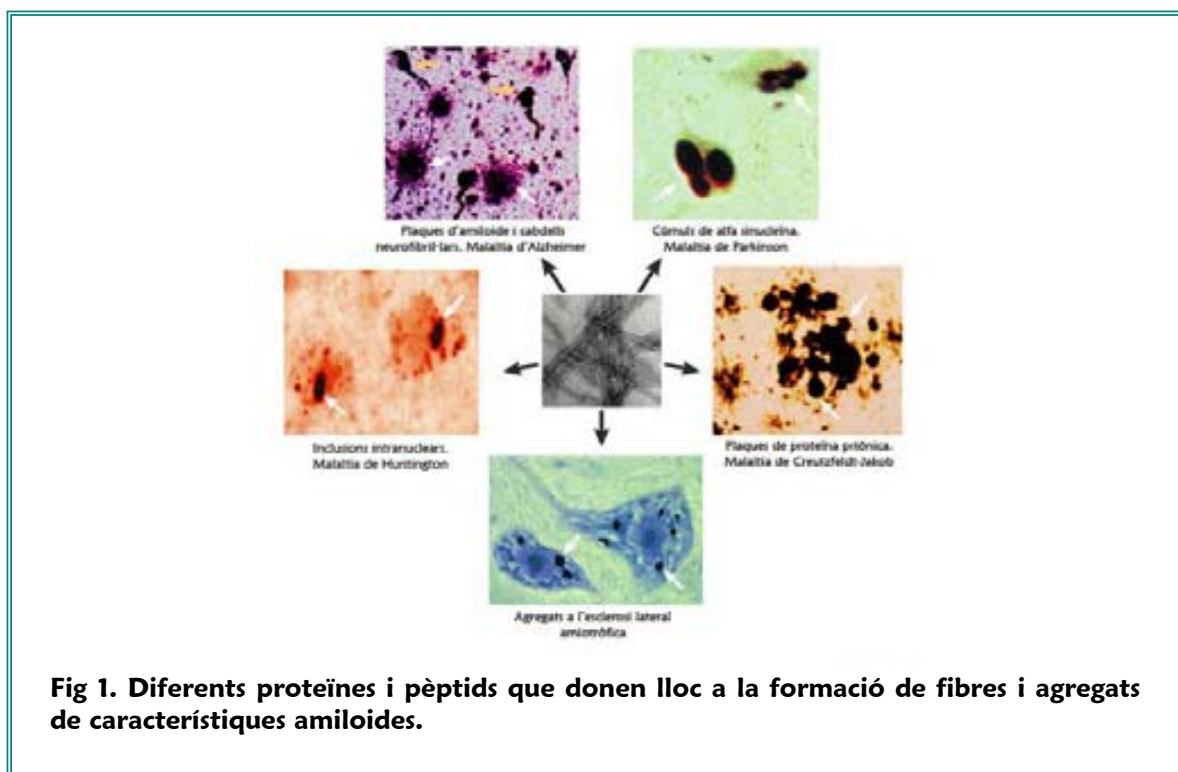
Les proteïnes adquireixen la seva estructura tridimensional mitjançant un procés de plegament, en el qual cada seqüència proteica adopta una conformació nàdida o de mínima energia. Gràcies a aquest procés, les proteïnes poden dur a terme la seva funció correcta i, per aquest motiu, les cèl·lules tenen mecanismes per evitar o desfer els plegaments erronis. Tot i això, en els darrers anys s'han descobert una sèrie de patologies relacionades amb el plegament incorrecte de certes proteïnes, que provoquen la formació irreversible d'uns agregats fibril·lars insolubles, coneguts amb el nom de *fibres amiloides*. Actualment es coneixen més de 20 proteïnes (taula 1) involucrades en patologies relacionades amb la formació de fibres amiloides i, molt probablement, aquesta llista anirà creixent al llarg de temps (Dobson, 2003; Dobson, 2004)

Taula 1. Malalties relacionades amb el plegament anòmal de proteïnes (adaptat de Dobson, C. M. 2004)

Malaltia	Proteïna	Lloc de plegament
Hipercolesterolèmia	Receptor de la lipoproteïna de baixa densitat	RE
Fibrosi quística	Regulador transmembranal de la fibrosi quística	RE
Fenilcetonúria	Fenilalanina hidroxilasa	Citosol
Malaltia de Huntington	Huntingtina	Citosol
Osteogènesi imperfecta	Procolagen	RE
Anèmia falciforme	Hemoglobina	Citosol
Deficiència de α 1-Antitripsina	α 1-Antitripsina	RE
Malaltia de Tay-Sachs	α -Hexosaminidasa	RE
Malaltia d'Alzheimer	Pèptid β amiloide/Proteïna tau	RE
Malaltia de Parkinson	A-Sinucleïna	Citosol
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob	Proteïna priònica	RE
Retinitis pigmentosa	Rodopsina	RE
Cataractes	Cristal·lins	Citosol

De fet, sota condicions adequades, un gran nombre de proteïnes sense homologia seqüencial són capaces de formar fibres amiloides. Aquesta característica comuna i el fet que les proteïnes i els pèptids amiloides no comparteixin un origen comú ni tinguin seqüències polipeptídiques similars fa pensar en la possibilitat d'un mecanisme general d'agregació de qualsevol proteïna o pèptid amiloide (fig. 1). Les fibres amiloides a les quals donen lloc presenten unes característiques moleculars comunes, que serveixen per a la seva diagnòsi clínica:

- ✓ Tenen un grau d'estructuració molecular alt de manera que es poden tenyir amb vermell Congo i donen lloc a una birefringència de color verd quan són observades sota llum polaritzada.
- ✓ Uneixen tioflavina T i així donen lloc a complexos fluorescents.
- ✓ Tenen una morfologia fibril·lar no ramificada i un diàmetre de 6-10 nm, quan s'observen per microscòpia electrònica.
- ✓ Estan formades per elements més fins anomenats protofibril·les.
- ✓ Les cadenes polipeptídiques adopten una estructura de fulla plegada β , on les fulles β individuals s'orienten perpendicularment a l'eix longitudinal de la fibra.
- ✓ Són resistents a l'acció de proteases.



1.1 Malaltia d'Alzheimer. Proteïna precursora d'amiloide i β -amiloide.

1.1.1 Característiques generals de la MA

La malaltia d'Alzheimer (MA) és la malaltia neurodegenerativa més comuna entre les demències existents avui en dia, i cursa amb alteracions cognitives i neuropsiquiàtriques (Ruiz-Nuño et al., 1998). Durant el procés normal de l'envelliment hi ha un declivi de les funcions sensorials i motores, acompanyat d'una disfunció cognitiva lleu (Corey-Bloom, 2002). Tanmateix, la demència comprèn un grup de disfuncions caracteritzades per un deteriorament gradual de les habilitat intel·lectuals, fins al punt d'originar problemes socials greus (Dubois and Deweer, 1998). La prevalença dels casos de demència en persones de més de 80 anys és aproximadament d'un 30 %, i la MA representa un 50–70 % del total dels casos (Fernando and Ince, 2004).

Els factors de risc que predisposen a patir aquesta malaltia no són ben coneguts. L'evidència més clara que existeix una contribució genètica en l'etiologia de la MA és l'existència de famílies en les quals la malaltia es transmet seguint un patró autosòmic dominant i on l'aparició de la malaltia es dona en edats primerenques, entre 35 i 55 anys (Campion and Brice, 1998; Roses, 1997; Shepherd et al., 2009). Malgrat tot, la majoria dels casos de MA (> 95 %) apareixen en edats superiors als 60 anys; és per això que es dedueix que aquestes mutacions representen només una petita contribució davant al risc general de desenvolupar la malaltia (Cummings, 1995).

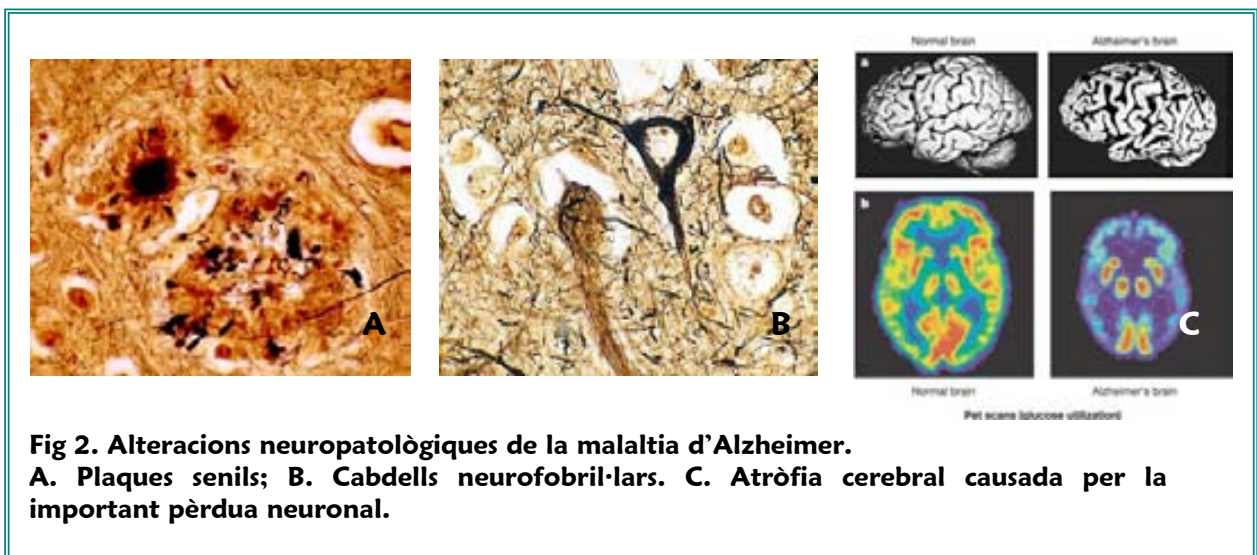
1.1.2 Alteracions neuropatològiques

La MA es caracteritza per la presència d'alteracions neurològiques greus, anatomopatològiques i fisiopatològiques (Corey-Bloom, 2002; Dubois and Deweer, 1998) (Kim and Tsai, 2009). Entre les primeres alteracions que apareixen s'ha descrit una atrofia difusa i progressiva a l'escorça cerebral amb presència de plaques de material amiloide (plaques senils), a més de més de cabdells neurofibril·lars de proteïna tau (τ) fosforilada i angiopatia amiloide (Rang et al.,

2003b). Com a conseqüència de tot això, existeix una pèrdua neuronal selectiva de les àrees d'associació i del sistema límbic mentre la resta de zones cerebrals es mantenen inalterades (Dubois and Deweer, 1998). La pèrdua de terminals sinàptics sembla que és l'últim pas relacionat amb la mort neuronal.

Pel que fa a les alteracions fisiopatològiques s'ha observat que al neocòrtex i l'hipocamp hi ha pèrdua d'un gran nombre de neurones, i són les neurones del sistema colinèrgic el grup més afectat (Rang et al., 2003a).

Els canvis anatomopatològics que s'observen a la MA són deguts principalment a la formació i l'acumulació de la proteïna β -amiloide i la proteïna τ (Bharadwaj et al., 2008) (Luque and Jaffe, 2009) (fig. 2), encara que no totes les regions cerebrals afectades responen de la mateixa manera a aquests canvis patològics. Així, la proteïna β -amiloide es diposita en regions afectades i no afectades del cervell; no obstant això només en les àrees d'associació i a les regions del sistema límbic provoca una reacció inflamatòria que és responsable de la destrucció neuronal (Dudal et al., 2004); (Weiner and Selkoe, 2002).



1.1.3 Importància de les plaques senils: la proteïna β -amiloide

Les plaques senils, també conegudes com plaques amiloides, són estructures esfèriques entre 20–25 μm de diàmetre, localitzades principalment a l'espai extracel·lular (Meyer-Luehmann et al., 2003). Estan formades per conglomerats de cossos i prolongacions neuronals degenerades al voltant de dipòsits centrals d'un pèptid de longitud variable (29–43 aminoàcids) i d'un pes de 4 a 6 KDa, anomenat proteïna β -amiloide (βA).

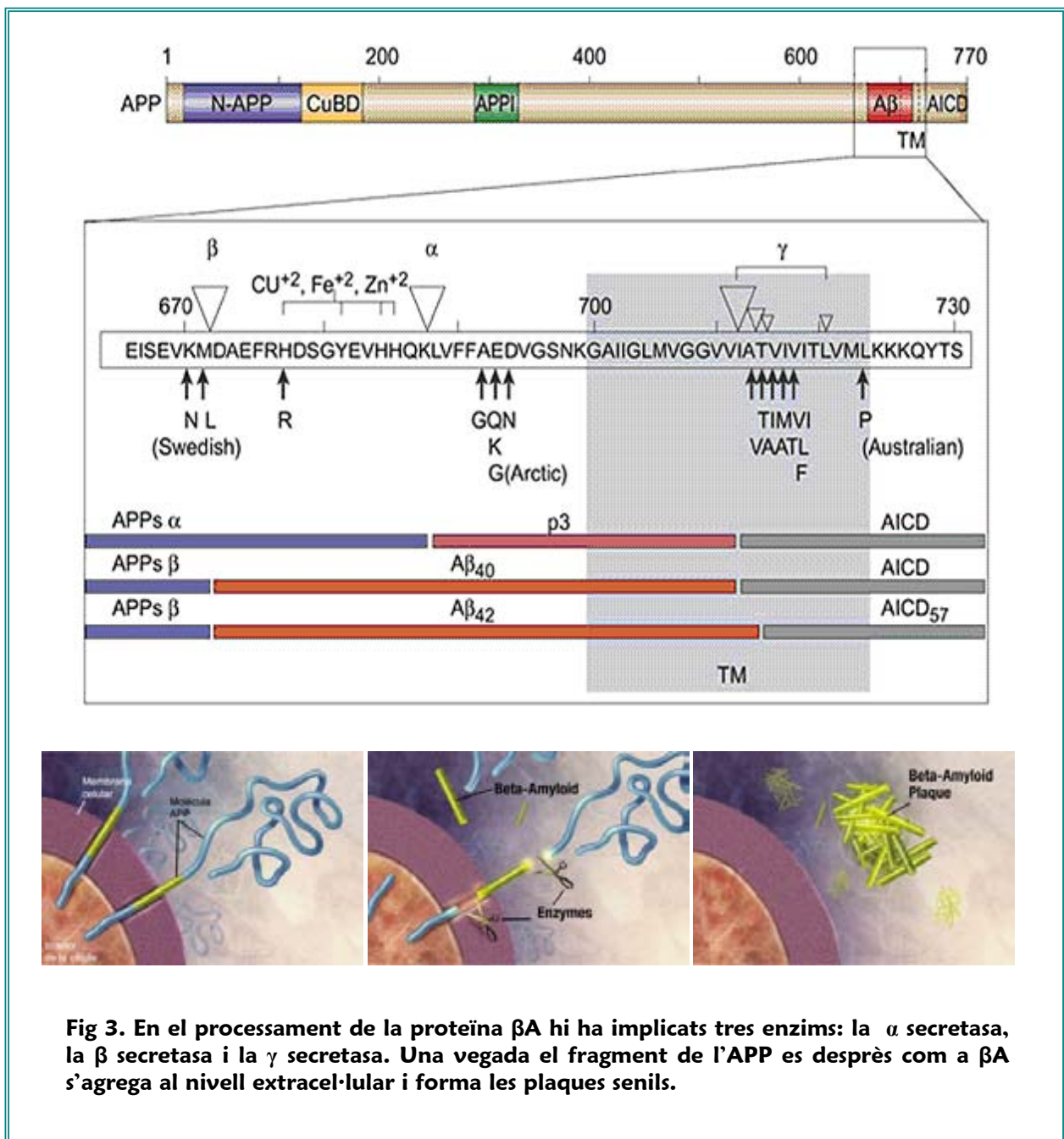


Fig 3. En el processament de la proteïna βA hi ha implicats tres enzims: la α secretasa, la β secretasa i la γ secretasa. Una vegada el fragment de l'APP es desprèn com a βA s'agrega al nivell extracel·lular i forma les plaques senils.

En condicions normals aquest pèptid es genera mitjançant la proteòlisi del pèptid precursor de la proteïna amiloide (APP); per part, de l'enzim α -secretasa, i posteriorment és secretada a l'espai extracel·lular com una proteïna soluble amb conformació (Thinakaran and Koo, 2008) d'hèlix α (Esch et al., 1990). Tanmateix, en pacients amb MA, la proteòlisi de l'APP es duta a terme per altres secretases, la β -secretasa (Cole and Vassar, 2008; Vassar et al., 2009) i la γ -secretasa, i es dona lloc a un nou pèptid extracel·lular, en aquest cas insoluble, amb conformació de fulla plegada β (Dekosky and López, 1998) (fig. 3)

Aquest fragment proteic té una gran tendència a agregar-se i forma oligòmers insolubles que es dipositen al cervell en forma de plaques senils i a les parets de les artèries de diàmetre mitjà; així, apareix l'angiopatia amiloide. La presència de plaques senils, no obstant això, no tan sols s'observa en individus afectats de MA, també s'ha descrit la seva presència (i la de cabdells neurofibril·lars), en baixes quantitats, en cervells d'individus d'edat avançada sense signes de demència i en individus amb neuropaties com la malaltia de Cretzfeldt-Jakob (Armstrong et al., 2001; Muramoto et al., 1992).

Malgrat la causa que provoca l'agregació de la β A i la posterior formació de plaques senils no és del tot coneguda, tampoc ho és l'origen de la seva toxicitat malgrat que nombrosos autors han suggerit el rellevant paper de l'estrès oxidatiu (Boyd-Kimball et al., 2004; Miranda et al., 2000), les disfuncions en l'homeòstasi del calci neuronal (Dreses-Werringloer et al., 2008; Kim et al., 2000) (Kawahara et al., 2009) o els processos inflamatoris (Grossman, 2003).

1.1.4 Model d'agregació del pèptid β A

Avui en dia no es coneixen amb detall els esdeveniments moleculars que tenen lloc en el procés d'agregació de la β A i de la consegüent formació de plaques senils. Tot i així, se sap que el pèptid és secretat a l'espai extracel·lular en forma monomèrica, on mitjançant un procés d'associació dona lloc a unes fibril·les que

s'acoblen entre si per donar lloc a les conegudes fibres amiloides, resistents a proteases .

Alguns dels estudis realitzats in vitro sobre la caracterització cinètica del procés de fibril·logènesi del pèptid β A suggereixen una conversió d'estructura desordenada a estructura β a través d'un intermediari ric en estructura α (Kirkitadze et al., 2001). El contingut de fulla plegada β creix exponencialment fins a la formació de fibres amiloides.

El model d'agregació majoritàriament acceptat consisteix en un mecanisme de polimerització dependent de nucleació (fig. 4). Aquest model comença amb una etapa lenta de formació de nuclis d'agregació que oligomeritzarien i donarien lloc a protofibril·les.

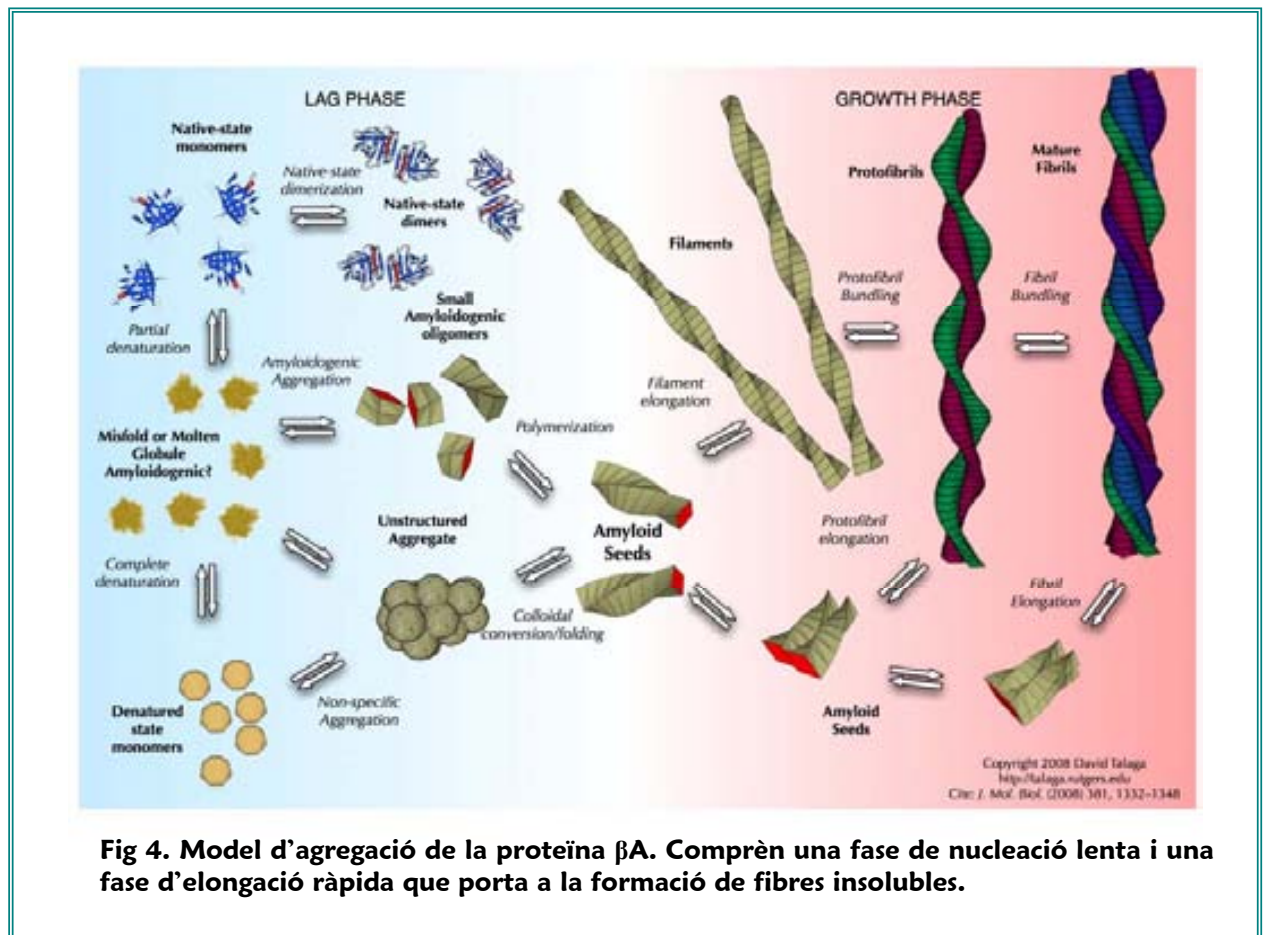


Fig 4. Model d'agregació de la proteïna β A. Comprèn una fase de nucleació lenta i una fase d'elongació ràpida que porta a la formació de fibres insolubles.

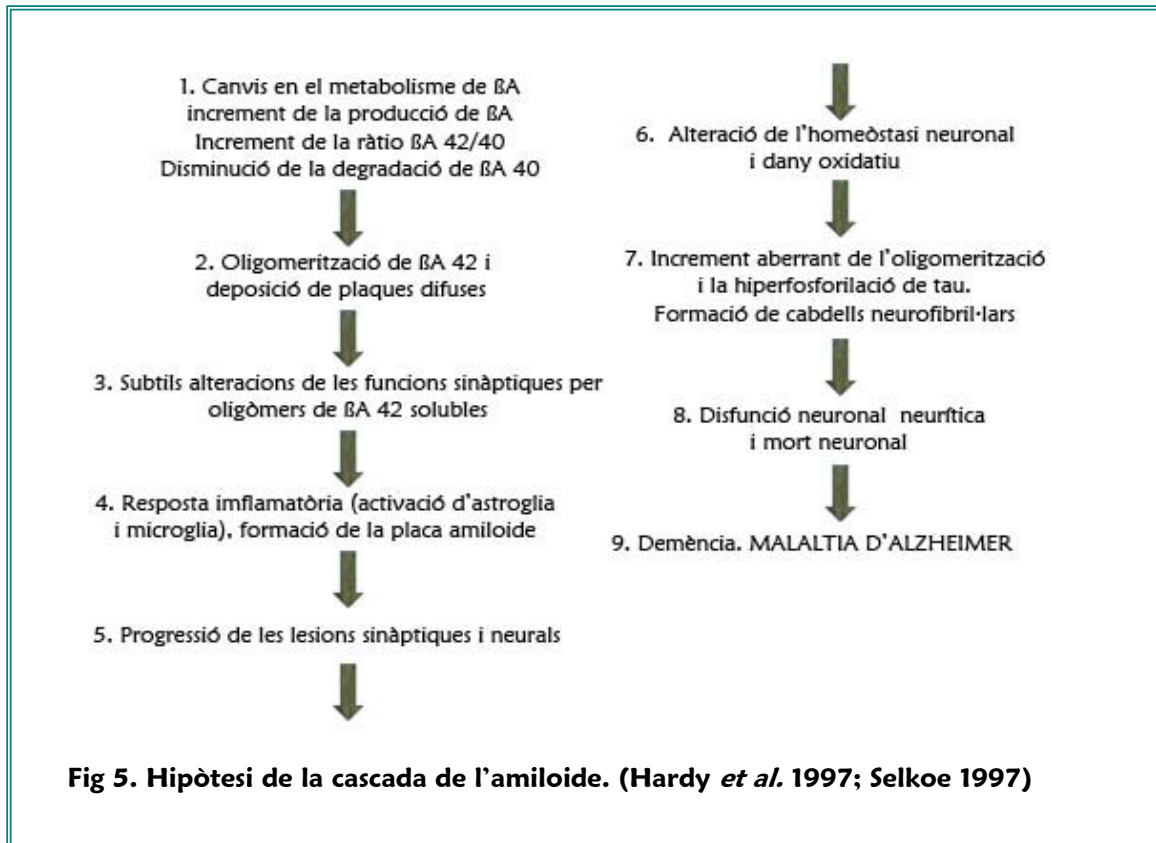
En la segona etapa, l'elongació, es formarien ràpidament les fibres madures per associació i/o addició de monòmers als extrems de les protofibril·les. Aquesta etapa d'elongació tindria un caràcter exponencial irreversible (Goldsbury et al., 2000; Jarrett et al., 1993; Krebs et al., 2009).

1.1.5 La hipòtesi de la cascada de l'amiloide

La hipòtesi de la cascada de l'amiloide postula que la producció, agregació i deposició de β A en les plaques amiloides és el fet desencadenant de la malaltia, que condueix al trencament de la comunicació entre cèl·lules (fig. 5). Per tant, l'acumulació de cabdells neurofibril·lars, la resposta inflamatòria, la pèrdua i la mort neuronal, el dany vascular i la demència associades serien conseqüència de la formació d'aquestes plaques (Hardy and Selkoe, 2002).

Tot i així, en els darrers anys han sorgit observacions i fets experimentals que qüestionen la implicació de les plaques de β A. Un exemple és que l'acumulació de plaques amiloides no és un fet específic de la malaltia sinó que sembla un marcador normal d'envelliment (Davies et al., 1988) de tal manera que la presència de plaques en persones afectades per la MA seria només un indicador d'un envelliment accelerat.

D'altra banda, l'increment de la producció de β A sembla que és causada com a resposta a danys del sistema nerviós central com, per exemple, la isquèmia. De fet, en una situació d'estrès energètic causat per un dany oxidatiu, la cèl·lula incrementaria els seus nivells de β A com a mesura de protecció, ja que β A podria actuar com a antioxidant (Cuajungco et al., 2000). Totes aquestes proves i el fet que les formes oligomèriques i prefibril·lars que precedeixen a la formació de fibres amiloides semblen ser tòxiques (Hartley et al., 1999) han fet revisar la tradicional teoria de l'amiloide.



1.2 Encefalopaties espongiformes transmissibles. Prions

1.2.1 Característiques generals de les encefalopaties espongiformes transmissibles

Les encefalopaties espongiformes transmissibles (EET) són un grup de malalties neurodegeneratives associades a un plegament aberrant de la proteïna priònica (PrP^C) (Prusiner *et al.*, 1998; Prusiner, 1998). Les proteïnes amb plegaments aberrants tenen la tendència intrínseca de formar agregats extracel·lulars i estructures fibril·lars que poden acabar en la formació de plaques amiloides similars a les observades a la MA, la malaltia de Parkinson i altres desordres associats al plegament erroni de les proteïnes (Soto, 2003).

Les patologies priòniques han estat àmpliament estudiades durant les darreres dècades atès el seu gran impacte econòmic i social. La més coneguda d'aquestes malalties és l'encefalopatia espongiforme bovina (BSE), coneguda col·loquialment com “malaltia de les vaques boges”, i la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (CJD),

l'anàloga en humans. Però els desordres priònics inclouen moltes altres patologies neurològiques que afecten els humans o els animals com l'insomni familiar fatal, el *kuru*, la síndrome de Gertsman-Straussler-Scheiker, l'*scrapie* i la malaltia del desgast crònic (Collinge, 2001; Prusiner et al., 1998).

La majoria dels pacients afectats presenten una demència progressiva i irreversible. L'aparença macroscòpica dels cervells és pràcticament normal i, a l'igual que en la MA, existeixen protocols de diagnosi ben estandarditzats, però és l'examen *postmortem* l'única eina eficaç fins ara per assegurar un bon diagnòstic. Tant en humans com en altres animals hi ha unes característiques comunes (fig. 6), com són ara la mort i la pèrdua neuronal, amb la consegüent espongiïtat, hipertròfia i proliferació de l'astroglia, i formació de plaques amiloides, principalment al cerebel. Totes aquestes lesions neurològiques condueixen a una pèrdua gradual de la funció muscular i una aparició lenta i irreversible de demència, que acaben provocant inevitablement la mort del pacient (Budka et al., 1995).

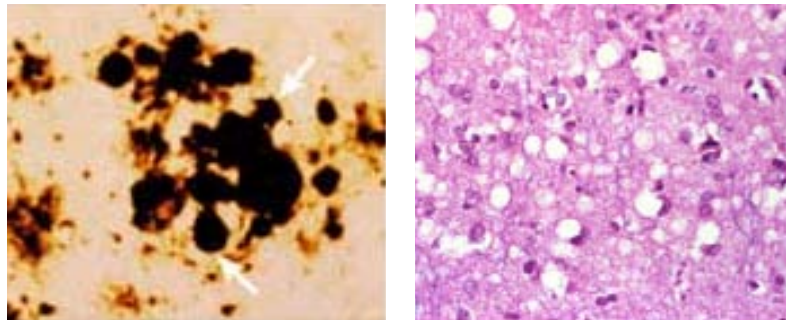


Fig 6. Agregats causants pel plegament aberrant i l'agregació de PrP^{Sc}; aspecte espongiforme que mostra l'anatomia patològica del cervell d'un pacient de Cretzfeldt-Jakob.

Les EET s'agrupen en formes esporàdiques, familiars i infeccioses. La forma esporàdica de la malaltia de Cretzfeldt-Jakob és la més comuna en humans, suposa entre un 90–95 % dels casos, majoritàriament en individus de més de 60 anys

(Abid and Soto, 2006). Tots els casos familiars descrits son deguts a mutacions al gen que codifica per la proteïna priònica (Prnp) (Collinge, 2001). La severitat i l'edat d'aparició de la malaltia depenen de la posició i del tipus de mutació (Prusiner and Scott, 1997).

Les formes infeccioses de la malaltia representen menys d'un 1 % dels casos, malgrat que la incidència d'aquestes formes és baixa, son les que han tingut unes repercussions econòmica i social més grans tant a Europa com als Estats Units.

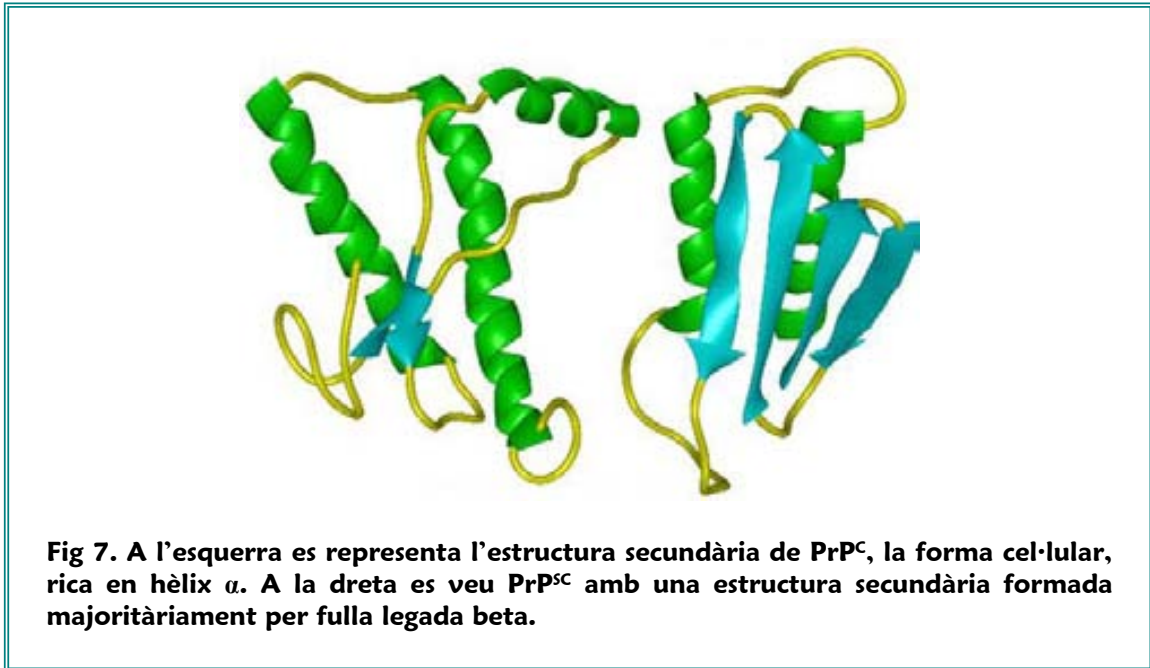
1.2.2 Prions

Des del final dels anys 60 diferents malalties han estat agrupades sota el nom d'encefalopaties espongiformes transmissibles (EET), fent referència a l'evolució lenta i irreversible i a la característica espongiós cerebral trobada en els individus afectats, i que acaba amb la mort, i la possibilitat de transmissió de la malaltia. Una vegada descobert el caràcter infecciós i transmissible d'aquestes malalties, els investigadors van començar la cerca de l'agent infecciós responsable. Concretament, T. Alper i J.S. Griffith, van suggerir de manera independent la possibilitat de l'existència d'un agent infecciós sense naturalesa d'àcid nucleic i capaç de causar i transmetre malalties. Però no va ser fins al 1982, que S.B. Prusiner (Supattapone et al., 2000) va aconseguir aïllar i purificar l'agent infecciós responsable d'aquestes patologies, i va introduir el terme *prió* (*proteïnaceous infectious particle*) per diferenciar el nou agent infecciós d'altres agents patògens com els virus, els viroides, els bacteris, els fongs o els paràsits.

La proteïna priònica, identificada originàriament en ratolins infectats amb tremolor ovina o *scrapie*, està codificada per un gen cromosòmic de còpia única. Aquest gen està altament conservat i s'ha identificat en més de 30 espècies de mamífers (Chesebro et al., 2005; Oesch et al., 1985).

El prió és una glicoproteïna de membrana que s'expressa normalment en totes les cèl·lules del teixit nerviós, i de la qual se'n coneixen dues isoformes: la forma

cel·lular (PrP^{C}), que és la forma present normalment en les neurones, i la forma patògena (PrP^{Sc}), que és la forma aberrant causant de la malaltia, anomenada així perquè va ser descoberta en animals afectats per la malaltia *scrapie*. PrP^{C} i PrP^{Sc} comparteixen la mateixa seqüència polipeptídica, només difereixen en les seves estructures secundària i terciària (fig. 7).



La teoria priònica proposada per Prusiner suposa l'existència de dues maneres diferents de plegament per a una mateixa seqüència polipeptídica i, a més, el replegament de la PrP^{C} per acció de la PrP^{Sc} implica un flux d'informació d'una proteïna a una altra al nivell d'estructura terciària i sense la participació d'àcids nucleics, contradient clarament el dogma central de la biologia.

La funció biològica de la proteïna priònica encara roman desconeguda. Sembla que la seva presència en el sistema nerviós central pot estar relacionada amb la supervivència de les neurones de Purkinje (Bueler et al., 1992; Sakaguchi et al., 1996).

1.2.3 Estructura i propietats de PrP^C i PrP^{SC}

A mitjan els anys 80 es va caracteritzar el gen que codifica per la proteïna priònica, com també es van dur a terme nombrosos estudis estructurals i bioquímics que van revelar els fascinants aspectes de la biologia priònica (Oesch et al., 1985) (Basler et al., 1986).

Una de les particularitats més sorprenents de la proteïna priònica és que pot ser plegada, com a mínim, en dues conformacions: la proteïna normal PrP^C i la conformació patològica PrP^{SC}. Totes dues isoformes tenen la mateixa seqüència aminoacídica i no s'ha demostrat que pateixin cap canvi posttranscripcional (Stahl et al., 1987). El canvi estructural de PrP^C a PrP^{SC} consisteix en una alteració dràstica de l'estructura i de les propietats bioquímiques de la proteïna (Cohen and Prusiner, 1998). (Cobb and Surewicz, 2009)

La PrP^C és una cadena polipeptídica de 250 aminoàcids, depenent de l'espècie, en la qual hi ha una seqüència senyal de 22 residus a l'extrem N-terminal, una sèrie de repeticions d'un octapèptid PHGGWGQ, quatre segments molt conservats en les posicions 109-122, 129-140, 178-191 i 202-218, i una regió hidrofòbica C-terminal d'unió a la membrana a través d'un glicofosfatidilinositol (Schatzl et al., 1995; Yehiely et al., 1997). És sensible a proteases i està formada per quatre zones d'estructura secundària anomenades H1, H2, H3 i H4, on s'identifiquen tres hèlixs α i dues fulles β . Respecte al metabolisme cel·lular de PrP^C, estudis de translocació in vitro posen de manifest tres formes topològiques de PrP: una forma de secreció i dues formes transmembrana que difereixen en la seva orientació. La forma de secreció és transportada en vesícules de secreció a la superfície cel·lular, on s'uneix a la membrana a través de glicofosfatidilinositol i s'acumula preferentment en els dominis rics en colesterol o rafts lipídics (Stahl et al., 1987; Taraboulos et al., 1992), igual que APP.

A les patologies priòniques, PrP^C és transformada posttraduccionalment en una isoforma anomenada PrP^{SC} (Hsiao and Prusiner, 1991; Yehiely et al., 1997). Aquesta conversió, que té lloc en caveoles i rafts, es caracteritza per un canvi

dràstic en les propietats fisicoquímiques de la molècula (Caughey and Raymond, 1991; Taraboulos et al., 1992; Yehiely et al., 1997).

PrP^C és soluble en detergents mentre que PrP^{Sc} forma uns agregats insolubles. PrP^C és alliberada de la membrana en forma soluble per digestió amb fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, mentre que PrP^{Sc} no és susceptible a l'acció enzimàtica i necessita d'un tractament desnaturalitzant previ per poder eliminar glicofosfatidilinositol. PrP^C és sensible a l'acció de preteases, però PrP^{Sc} experimenta una proteòlisi limitada que dóna lloc a una forma truncada en el seu extrem N-terminal, anomenada PrP²⁷⁻³⁰. Aquesta forma manté la capacitat infecciosa (Caughey and Raymond, 1991) (Soto and Estrada, 2008) i és el nucli resistent a les proteases (Hope et al., 1986; Supattapone et al., 2000). De fet, és el principal component trobat en les plaques amiloides presents en cervells d'individus afectats.

Les modificacions posttraduccionals de naturalesa covalent no semblen ser la causa directa del procés de conversió ja que el procés té lloc en dominis específics de membrana, com rafts i caveoles (fig. 8), on les proteïnes unides a glicofosfatidilinositol tendeixen a ancorar-se (Taraboulos et al., 1995). D'altra banda, la glicosilació determina el trànsit intracel·lular de la proteïna (Supattapone et al., 2000).

Els estudis espectroscòpics han permès establir que l'estructura secundària de PrP^{Sc} solubilitzada amb detergents, a diferència de la PrP^C, presenta majoritàriament fulles β intermoleculares capaces de formar fibres amiloides (Caughey and Raymond, 1991; Pan et al., 1993) (Soto et al., 2006). Aquesta dualitat conformacional hèlix- α /fulla β sembla que està localitzada principalment a la regió 106–126, la qual produeix gran neurotoxicitat en forma de pèptid sintètic (Forloni et al., 1993b; Gasset et al., 1992).

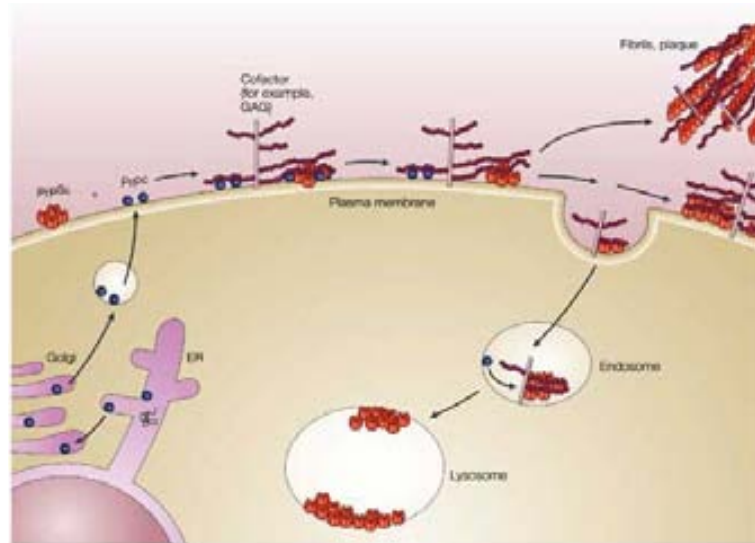


Fig 8. Model de formació de fibres i plaques amiloides derivades del plegament aberrant, insolubilització i acumulació de PrP^C.

1.2.4 Models de conversió de PrP^C en PrP^{Sc}

El mecanisme mitjançant el qual es propaguen els prions no es coneix exactament. Tot i que alguns investigadors segueixen postulant la necessitat d'un àcid nucleic específic de prions, no hi ha prou evidències físiques ni químiques que en demostrin l'existència. En cas que existís, caldria esperar que l'àcid nucleic dirigís la replicació dels prions a través d'un mecanisme semblant al dels virus.

La multiplicació de la infectivitat dels prions és un procés exponencial que implica obligatòriament la conversió posttraduccional de PrP^C a PrP^{Sc}, un canvi conformacional en l'estructura de la proteïna, que pot ser induït per canvis en el microambient cel·lular, com per exemple, el pH o la concentració de cations divalents (Bueler et al., 1993). La participació de PrP^C endògena en la conversió cap a la forma aberrant ha estat clarament demostrada en treballs amb models animals: els ratolins *knock-out* per al gen de PrP presenten resistència a la malaltia i són incapaços de produir noves partícules infeccioses (Hsiao and Prusiner, 1991); en canvi, en els ratolins normals la producció de prions augmenta

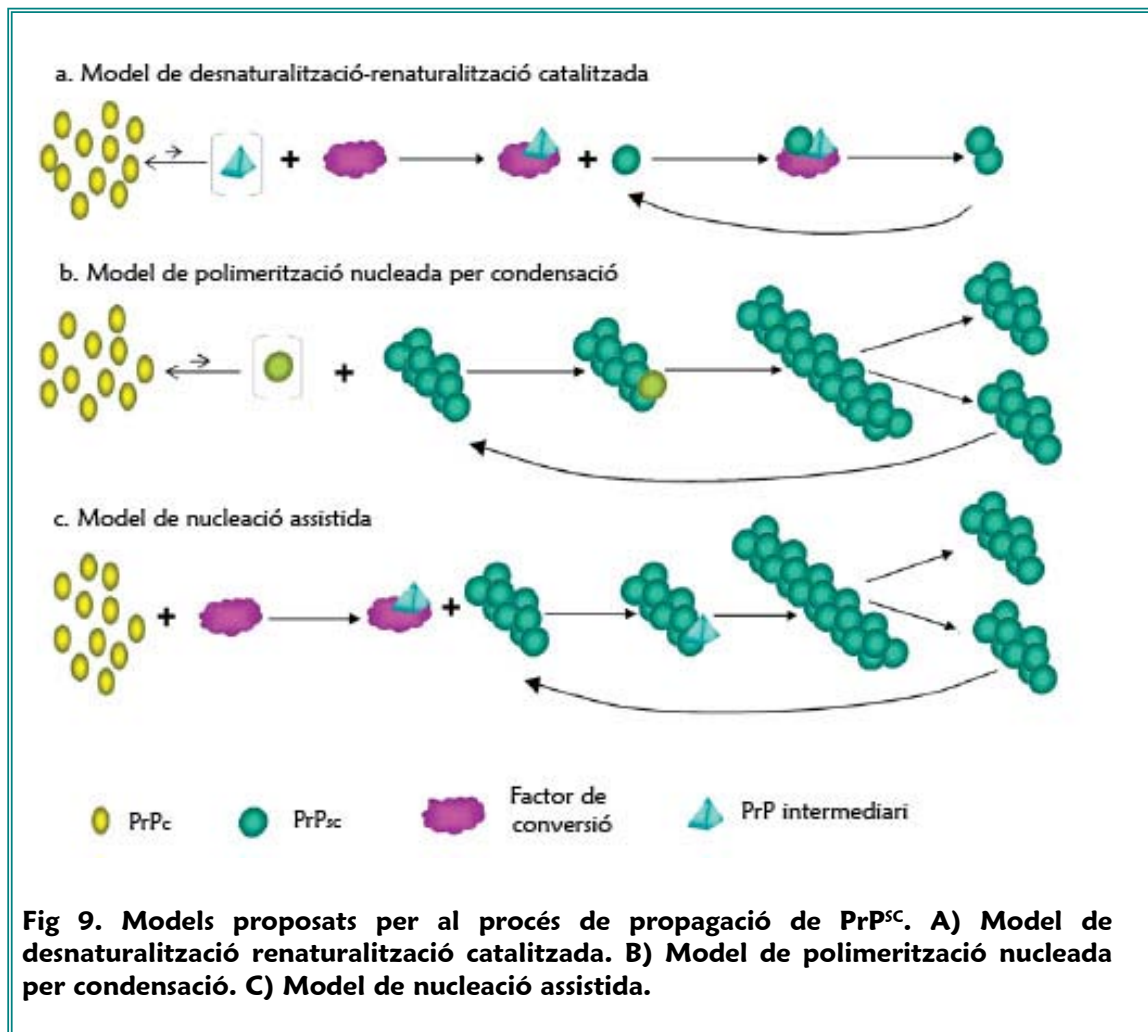
espectacularment durant la fase d'incubació. El nivell d'expressió de PrP^C és directament proporcional a la velocitat de formació de PrP^{Sc} i, per tant, inversament proporcional a la durada del temps d'incubació. Aquests resultats han portat a pensar que PrP^{Sc} és capaç de replicar-se a si mateixa a expenses de PrP^C. El procés de propagació del prió comença amb la interacció de la PrP^{Sc} exògena amb PrP^C o una forma parcialment desnaturalitzada PrP* (Costa et al., 1997; Scott et al., 1989). El reconeixement de PrP^{Sc} té lloc a través de la regió 96-167, i és necessària però insuficient la identitat de la seqüència (Bueler et al., 1993; Telling et al., 1995). D'altra banda, mutacions puntuals i variacions en la longitud de la cadena polipeptídica de PrP^C i/o alteracions metabòliques poden desencadenar situacions patològiques (Hsiao et al., 1989; Westaway et al., 1994).

Tot i aquestes premisses experimentals, encara es desconeix com PrP^{Sc} és capaç d'induir el canvi conformacional a PrP^C. D'aquesta manera s'han proposat tres models per al procés de propagació de PrP^{Sc} (Abid and Soto, 2006).

El model de “polimerització nucleada per condensació” proposa que el PrP^{Sc} monomèric existeix en equilibri amb PrP^C (fig. 9) (Jarrett et al., 1993; Kocisko et al., 1994). PrP^{Sc} monomèric representaria una forma poc abundant i transitòria de PrP i només s'estabilitzaria formant agregats ordenats. Els oligòmers estabilitzats actuarien com a nucli per l'addició de més PrP^{Sc} monomèric, formant polímers. Una vegada format el nucli, tindria lloc un procés autocatalític, de manera que el nucli creixeria per addicions successives i ràpides de noves molècules de PrP^C.

El model de “desnaturalització–renaturalització catalitzada” (Cohen and Prusiner, 1998) postula que el canvi conformacional és l'etapa limitant del procés ja que implica una desnaturalització i renaturalització de la cadena polipeptídica. PrP^C és el substrat de la reacció i PrP^{Sc} és el producte, de tal manera que la velocitat de reacció depèn de la concentració de PrP^C i és inversament proporcional al temps d'incubació. En aquesta reacció, PrP^{Sc} actuaria com un efector al·lostèric, regulant la conversió de PrP^C a PrP^{Sc}, i qualsevol anàleg de substrat, com per exemple, una

molècula de PrP^C de diferent espècie, retardaria la conversió i actuaria com un inhibidor competitiu. En aquest model Prusiner proposa una interacció directa entre totes dues isoformes (fig. 9) de manera que es formaria un intermediari heterodimèric PrP^C-PrP^{Sc} que, fins ara, no ha estat possible de detectar (Koster et al., 2005).



La clau del model de *nucleació assistida* (Abid and Soto, 2006) és la formació d'un intermediari estructural (PrP*) després de la unió de PrP^C a un factor de conversió. Aquesta conformació intermediària permetria dur a terme i mantenir els profunds canvis estructurals que impliquen la formació de PrP^{Sc}. L'existència d'intermediaris ha estat postulada en nombrosos estudis (Apetri et al., 2004; Apetri and Surewicz,

2002). Aquests intermediaris s'han descrit en condicions d'alteració de la solució, per exemple, amb la presència d'ions metàl·lics o canvis de pH (Glockshuber, 2001). Tanmateix, la importància d'aquests intermediaris encara s'ha d'establir.

2. NEURODEGENERACIÓ PATOLÒGICA I ESTRÈS OXIDATIU

2.1 Neurodegeneració patològica i estrès oxidatiu

Les malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, la malaltia de Huntington i la isquèmia es caracteritzen per la pèrdua i la disfunció de grups de neurones. La disfunció neuronal no necessàriament ha de ser la conseqüència de la mort neuronal, també pot ser deguda a la pèrdua sinàptica, a l'alteració de la potenciació de llarg termini LTP o la disrupció de la senyalització neuronal com a conseqüència de la patologia. Aquests fets generalment precedeixen la pèrdua neuronal en les malalties neurodegeneratives (Bredesen et al., 2006). L'envelliment és un dels factors determinants en aquestes malalties, la qual cosa suggereix que l'acumulació d'estressants neuronals al llarg del temps causen mort cel·lular. Malgrat tot, durant l'envelliment normal hi ha una pèrdua relativament petita de neurones, que contrasta amb un alt grau de mort neuronal en les malalties neurodegeneratives (Yankner et al., 2008).

L'estudi de la mort neuronal en malalties neurodegeneratives és complicat. Gran part de les evidències de què disposem provenen d'estudis realitzats amb teixits de pacients *postmortem*. Aquestes evidències són difícils d'acumular atesa la lenta evolució d'aquestes malalties, que fa que només una minúscula part de les cèl·lules es trobin en procés de mort en el moment del decés del pacient. Com la mort cel·lular s'ha donat durant molts anys, les cèl·lules en estat de mort en aquest moment només són les que han mort recentment. Normalment aquests teixits són representatius dels últims estadis de la malaltia, moment llunyà del moment ideal per tractar els pacients i prevenir la mort neuronal. Habitualment les cèl·lules

presenten senyals mixts i són difícilment classificables en un tipus de mort o un altre.

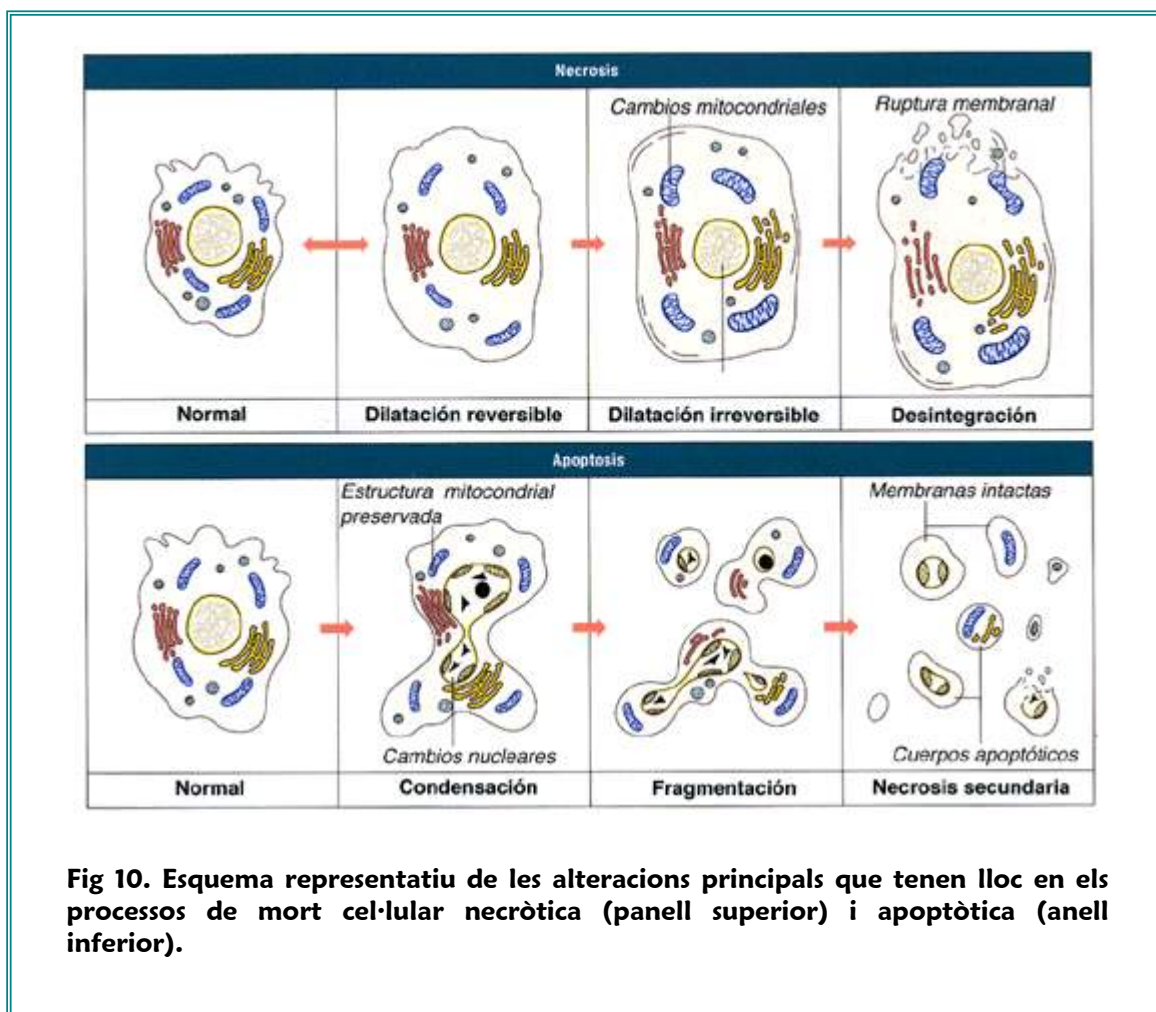
2.1.1 Mecanismes de la mort cel·lular en neurones

Malgrat que es reconeix que en les malalties neurodegeneratives hi ha mort neuronal, la manera en què moren les cèl·lules continua sent incerta. Hi ha un conjunt de vies reconegudes en les quals les cèl·lules neurals poden morir, incloent-hi l'apoptosi, la necrosi, la mort cel·lular autofàgica (ACD) i l'excitotoxicitat. Altres vies de mort cel·lular com l'oncosi i la paraptosi no han estat estudiades en neurones, i el paper d'aquests tipus de mort en neurodegeneració és desconegut, en gran manera per la manca de marcadors específics.

a) La necrosi: és una forma aguda de mort cel·lular. Es caracteritza per la pèrdua d'ATP i dissipació dels gradients iònics, que fan que es perdi l'homeòstasi iònica i provoca l'inflament de les cèl·lules per l'entrada d'aigua i la lisi cel·lular (fig. 10). Morfològicament la cèl·lula necròtica s'identifica principalment perquè ha perdut la integritat de la membrana plasmàtica i manté la membrana nuclear (Brown and Brierley, 1972). La necrosi causa inflamació de les regions properes com a conseqüència de l'alliberació del contingut cel·lular al medi extracel·lular. La mort cel·lular per necrosi es dona habitualment com a causa d'un estrès cel·lular sever com per exemple elevats nivells de toxines. La necrosi és una mort cel·lular no programada, en la qual no hi ha cap via bioquímica identificable, i un cop iniciada no ofereix molt potencial terapèutic ja que és un fenomen agut.

b) L'apoptosi: és un tipus de mort cel·lular programa en la qual té lloc un procés actiu de síntesi de novo de proteïnes (Kerr et al., 1972). Els components necessaris per a la senyalització apoptòtica estan codificats genèticament, i romanen inactius fins que determinats estímuls deleteris els activin. Per contrast amb la necrosi, es caracteritza per manteniments de l'ATP cel·lular i per l'inici de les vies bioquímiques que porten a l'engorgiment cel·lular, la condensació de la cromatina i la formació de cossos apoptòtics i, finalment, la fagocitosi d'aquestes partícules. No està associada ni a lisi cel·lular ni a inflamació. A diferència de la cèl·lula

necròtica, l'apoptòtica manté intacta la seva membrana plasmàtica fins a les últimes etapes de la mort. Es podria interpretar que l'organisme pren la decisió que algunes cèl·lules s'autodestruïxin per evitar que alliberin el seu contingut intracel·lular per minimitzar el dany. Bioquímicament, l'apoptosi està associada amb l'activació de proteases caspases que inicien la via de les caspases activant l'efector de caspases (fig. 10). L'efector de les caspases talla una gran varietat de substrats de proteïnes i causa la degradació i la mort cel·lular (Stroh and Schulze-Osthoff, 1998). Hi ha com a mínim dues vies ben caracteritzades en les quals l'activació de les caspases s'inicia en mamífers. Aquestes són la via intrínseca (o mitocondrial) i la via extrínseca (el receptor de mort).



c) L'excitotoxicitat: és una mort particular de les neurones, que és causada per un excés d'activació del subreceptor de glutamat NMDA. Aquest tipus de mort té lloc com a conseqüència de la manca d'ATP produïda durant el procés d'isquèmia.

La pèrdua d'ATP produeix la despolarització de les neurones, estimula l'alliberament de neurotransmissors i impossibilita els sistemes de recaptació de neurotransmissor acoblats a ATP. Hi ha una discussió oberta sobre si l'excitotoxicitat pot ser considerada com un tipus de mort en part perquè està lligat amb l'activació tant de la necrosi com de l'apoptosi. Per exemple, experiments in vitro mostren que el glutamat pot causar tant necrosi com apoptosi (Bredesen et al., 2006).

d) L'autofàgia: és el mecanisme primari pel qual les orgànuls cel·lulars, els agregats de proteïna i algunes proteïnes es degraden a la cèl·lula. També pot ser una causa de mort coneguda com a mort cel·lular per autofàgia ACD deguda a una excessiva autofàgia (Nicholls et al., 1999). L'ACD té una morfologia particular que inclou reducció dels orgànuls, vacuolació del citoplasma i disrupció de la membrana, que comporta un inflamació local (Hornung et al., 1989). Malgrat l'autofàgia està habitualment associada a condicions de deprivació, on juga un paper prosupervivència proveint la cèl·lula d'aminoàcids i altres macromolècules, s'han detectat marcadors d'autofàgia en processos de mort cel·lular.

2.1.2 Relació entre diferents tipus de mort cel·lular

Molts estímuls de mort cel·lular poden induir més d'un model de mort dependent de les condicions, de la severitat de l'estímul estressant, de la seva duració, de l'estat de la cèl·lula en el moment de produir-se agressió sobretot pel que fa al nivell redox i de la integritat mitocondrial. Alguns investigadors proposen que existeix un *continuum* entre els mecanismes de mort cel·lular en la mort isquèmica i excitotòxica, amb l'apoptosi i la necrosi en els extrems oposats d'una escala que incorpora algunes però no totes les característiques ni de la necrosi ni de l'apoptosi (Cheung et al., 1998; Portera-Cailliau et al., 1997a; Portera-Cailliau et al., 1997b).

De fet, algunes toxines com el glutamat poden induir tant la necrosi com l'apoptosi.

Malgrat que clàssicament s'han presentat la necrosi i l'apoptosi com dos processos amb diferències morfològiques i bioquímiques clares, en els últims anys han aparegut evidències que algunes cèl·lules presenten morfologies intermèdies, i fins i tot s'han trobat mecanismes moleculars que només s'atribuïen a l'apoptosi, que juga un paper destacat en la mort necròtica (Cole and Perez-Polo, 2002; Fujikawa et al., 2002; Hou and MacManus, 2002; Moroni et al., 2001). El 2003, Jaeschke i Lemasters van definir el terme necroapoptosi per definir el fenotip intermedi que van trobar en cèl·lules hepàtiques després de la isquèmia (Jaeschke and Lemasters, 2003). A més a més, hi ha altres treballs que vinculen els dos tipus de mort (Schwab et al., 2002). Per tant, a l'hora d'estudiar algun d'aquests processos no hem d'oblidar que no es tracta de compartiments aïllats sinó que poden haver situacions intermèdies i/o que poden ser processos interrelacionats.

2.2 Estrès oxidatiu en les malalties neurodegeneratives

L'estrès oxidatiu es defineix com el balanç entre els processos bioquímics que porten a la producció d'espècies reactives de l'hidrogen (ROS) i els responsables de la seva eliminació, també anomenats cascada d'antioxidants. La investigació durant les últimes dècades ha parat atenció a aquest tipus d'estrès atesa la seva àmplia implicació en un gran nombre d'estats patològics i més notablement en els que incrementen la seva incidència amb els anys. És més, la teoria de la implicació dels radicals lliures en l'envelliment (Harman, 1981) és un dels principis centrals pels quals entenem els canvis bioquímics que tenen lloc al llarg de la vida.

Els ROS produeixen danys en totes les biomacromolècules (lípid, sucres, proteïnes i polinucleòtids), i aquest dany pot portar a la formació de productes secundaris que poden ser tan perjudicials com els ROS inicials. El sistema nerviós central és particularment vulnerable al dany oxidatiu com a conseqüència de la gran

utilització d'O₂, la relativament pobra concentració d'antioxidants clàssics i enzims relacionats i l'elevat contingut de lípids poliinsaturats, biomolècules més susceptibles a l'oxidació. A més, hi ha elevades concentracions regionals de metalls redox actius de transició capaços de generar catalíticament ROS. Per tant, no és sorprenent que l'estrès oxidatiu sigui un punt de discussió comú de les malalties neurodegeneratives, on el dany de les neurones pot reflectir tant l'increment dels processos oxidatius com la disminució de les defenses antioxidants.

L'estrès oxidatiu és una condició del dany cerebral associada a processos aguts (com l'infart cerebral o el traumatisme encefàlic) i també a malalties neurodegeneratives (com la malaltia d'Alzheimer o la malaltia de Parkinson). La causa és la generació i l'acumulació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) i espècies reactives del nitrogen (RNS) (Mangialasche et al., 2009). Aquestes espècies poden ser molècules amb radicals lliures o no, i poden reaccionar amb proteïnes, lípids i DNA produint-los l'oxidació i induint danys a la membrana cel·lular i el DNA, disfuncions del mitocondri i eventualment mort cel·lular (Adibhatla and Hatcher, 2008; Dong et al., 2009; Nunomura et al., 2009; Rao, 2009) L'estrès oxidatiu descriu un estat de desequilibri entre la producció i la detoxicació de ROS i RNS (Sies, 1991). En condicions normals les cèl·lules són capaces de defensar-se davant els danys causats pels ROS i els RNS mitjançant sistemes de defensa potents que inclouen estructures bioquímiques (ex. vitamina E) i enzims antioxidants (ex. superòxid dismutasa). A més a més, les cèl·lules poden reaccionar davant l'estrès oxidatiu ja sigui adaptant respostes destinades a activar mecanismes de reparació o si el dany és molt sever induint la mort cel·lular per apoptosi.

El cervell és particularment vulnerable al dany oxidatiu perquè té grans requeriments energètics i un gran consum fisiològic d'oxigen. A més a més, conté grans quantitats de metalls de transició que catalitzen la formació de ROS i té uns nivells relatius baixos d'antioxidants, com el glutatió, si els comparem amb els d'altres teixits de l'organisme (Behl, 2005). En processos d'envelliment normals hi ha un desequilibri entre els antioxidants i els prooxidants, que produeix una

acumulació de ROS segons l'edat (Ames et al., 1993). Atès que la malaltia d'Alzheimer és un desordre associat a l'edat, la implicació dels radicals lliures en aquesta patologia està en concordança amb la hipòtesi de la participació dels radicals lliures en l'envelliment. Hi ha un gran nombre d'evidències experimentals i histopatològiques que suporten el paper de l'estrès oxidatiu en l'etiologia i la patofisiologia de la malaltia d'Alzheimer (Behl, 2005; Miranda et al., 2000; Moreira et al., 2009; Pratico, 2008).

2.2.1 Estrès oxidatiu en l'etiologia i la patofisiologia de la malaltia d'Alzheimer

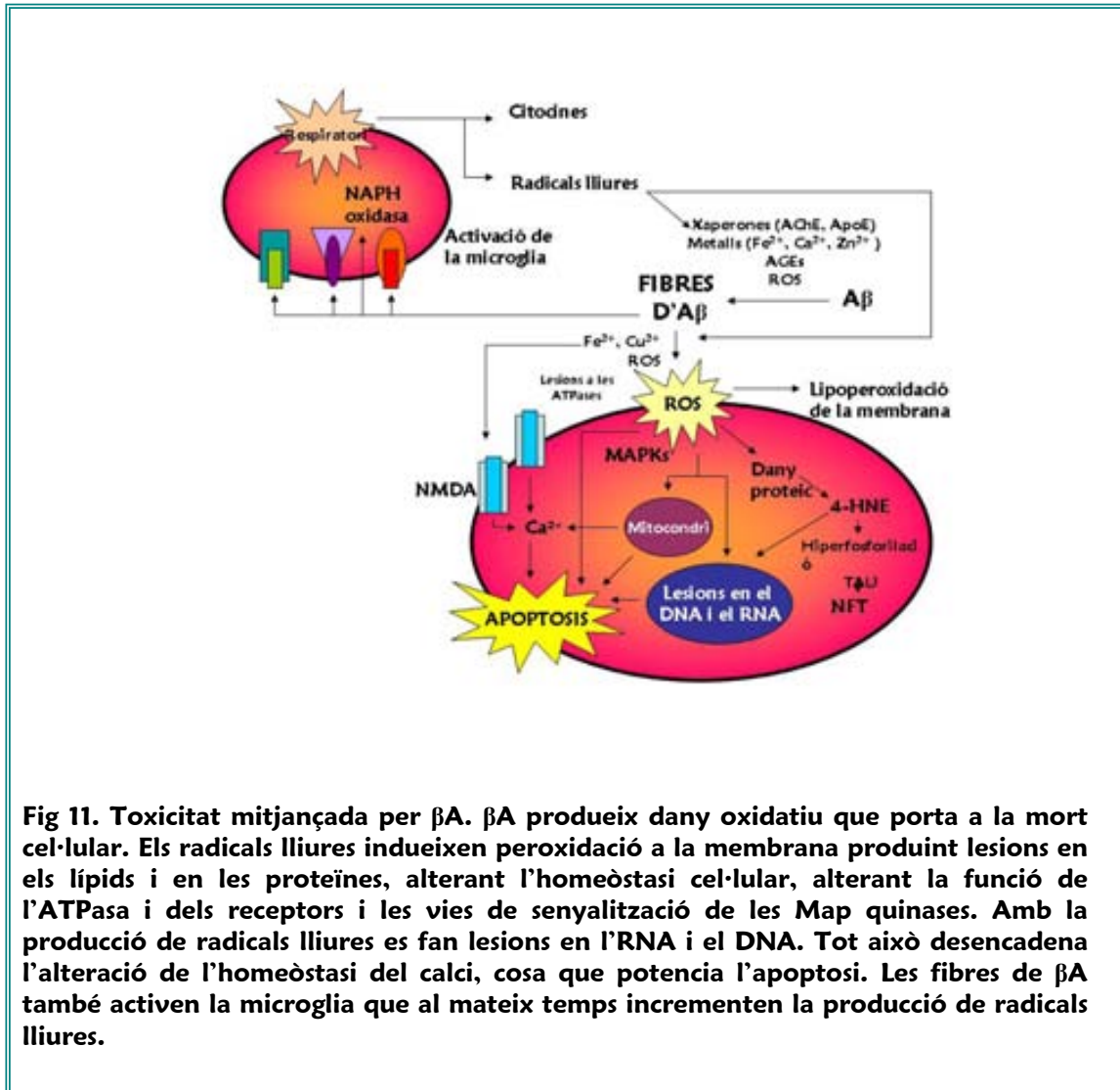
Agents oxidants i productes oxidatius, com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) o el 4-hidroxi-2-transnonenal (4-HNE), tenen capacitat demostrada d'incrementar els nivells intracel·lulars i secretats d' βA en cèl·lules neuronals i no neuronals (Frederikse et al., 1996; Misonou et al., 2000; Paola et al., 2000). H_2O_2 incrementa l'expressió del gen de la β -secretasa1 (BACE1) de manera dosi i temps dependent, cosa que es tradueix en un increment de βA_{1-40} i βA_{1-42} secretades en cèl·lules HEK 293 que sobreexpressen BACE1 (Tong et al., 2005). Més sorprenentment, l'expressió i l'activitat de la BACE1 és incrementada per prooxidants com el H_2O_2 a través de la producció de 4-HNE en neurones (Tamagno et al., 2002). El pretractament amb antioxidants com el α -tocoferol o la dehidroepiandrosterona (DHEA) reverteix l'expressió, els nivells de proteïna i d'activitat de la BACE1 induïts per estrès oxidatiu en cèl·lules NT2 (Tamagno et al., 2003; Tamagno et al., 2002).

S'han descobert nombrosos factors que alteren l'homeòstasi de l'oxigen de manera directa o indirecta (fig. 11). De tota manera, βA per si mateixa és una de les majors fonts de radicals lliures del cervell. Molts estudis han demostrat que βA genera H_2O_2 a través de reducció d'ions metàl·lics concomitantment amb la formació de TBARS (substàncies acidoreactives tiobarbitúriques) (Huang et al., 1999). Estudis in vitro han demostrat la implicació de l'estrès oxidatiu en la citotoxicitat mediada per βA en neurones (Behl, 1997) i cèl·lules vasculars (Munoz et al., 2005) mentre

que la vitamina E i altres antioxidants protegeixen davant de la citotoxicitat causada per β A.

Dues teories expliquen com les fibres de β A poden induir la formació de radicals lliures d'oxigen. L'una proposa que l'oxidació de la metionina 35 de l' β A1-42 és el mediador de l'estrès oxidatiu induït per radicals lliures en el cervells de pacients amb MA (Butterfield and Bush, 2004). L'altra proposa que és la tirosina 10 de l' β A la que té un paper clau en la producció d' H_2O_2 (Barnham et al., 2004). L'agregació d' β A indueix la generació de radicals lliures de manera metal·locatalítica que contribueix amb l'entrecreuament (*crosslinking*) d' β A, l'increment de la producció d'oligòmers i fibres d' β A. Aquests oligòmers tenen per ells mateixos capacitat citotòxica quan interactuen amb RAGE, i indueixen l'increment dels ROS intracel·lulars i, en conseqüència, l'activació de NF- κ B (Yan et al., 2000), o mitjançant altres mecanismes amb l'activació de les MAPKs. Els radicals lliures provoquen lesions en els àcids nucleics, a les proteïnes de la membrana, produint residus carbonil i nitration de proteïnes i produint la lipoperoxidació de la membrana (Mark et al., 1997).

A més a més, l'alteració del metabolisme de l'energia és una característica primerenca i predominant de la MA. Els mitocondris danyats produeixen ATP amb menys eficiència però en canvi produeixen ROS amb molta més eficiència (Harman, 1996; Miranda et al., 2000). β A també interromp l'homeòstasi cel·lular perjudicant la funció de les proteïnes reguladores de membrana. L'afectació de la funció de l'ATPasa, i l'activació dels receptors NMDA juntament amb el dany mitocondrial produeixen un increment dels nivells de calci intracel·lular que afegit al dany de lípids, proteïnes i DNA desencadena l'apoptosi cel·lular (Miranda et al., 2000). També s'ha demostrat que β A1-40 i β A1-42 down regulen "bcl-2", una proteïna antiapoptòtica clau, mentre β A1-42 upregula "bax" una coneguda proteïna que promou la mort cel·lular per apoptosi (Paradis et al., 1996).

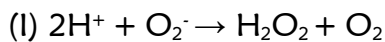


2.2.2 Mecanismes antioxidants

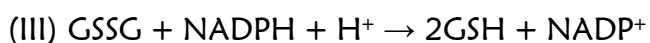
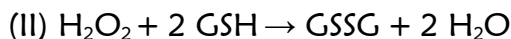
La rellevància de l'estrès oxidatiu no tan sols en l'etiologia sinó també en la progressió de la malaltia d'Alzheimer ha obert la possibilitat de l'ús d'antioxidants com a tractament d'aquesta malaltia. Els antioxidants són molècules o compostos que actuen com col·lectors de radicals lliures. El mecanisme cel·lular de protecció contra el dany causant per l'estrès oxidatiu implica antioxidants enzimàtics i no enzimàtics com la superòxid dismutasa (SOD), el sistema del glutatió, la catalasa, sistemes de la tioredoxin reductasa, les peroxidoxines (Prx), el glutaredoxin (Grx), la glutatió-S-transferasa, les vitamines i els estrògens.

a) Enzims antioxidants

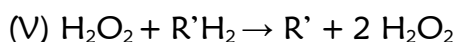
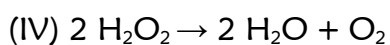
La superòxid dismutasa (SOD) és el major sistema de defensa contra l'anió superòxid O_2^- en totes les cèl·lules vasculares, de fet, la rellevància del paper protector en l'àmbit vascular va ser primerament evidenciat per l'observació del dany induït a l'endoteli per βA i era previngut per l'enzim SOD (Crawford et al., 1997; Thomas et al., 1996; Thomas et al., 1997). La SOD catalitza el pas d' O_2^- a O_2 i H_2O_2 en la reacció (I). L' H_2O_2 és posteriorment descomposta per altres enzims antioxidants.



El sistema del glutatió inclou glutatió, glutatió reductasa i glutatió peroxidasa. Aquest sistema és la major defensa a nivells baixos d'estrès oxidatiu i és considerat un dels enzims implicats en la hidròlisi de peròxid més importants al cervell. La glutatió peroxidasa catalitza el pas d' H_2O_2 i lípid peroxides a aigua i lípid alcohols, respectivament, utilitzant glutatió (GSH) com a cosubstrat (II). Després de ser oxidat, el GSH actiu és regenerat per l'acció de la glutatió reductasa (III).



La catalasa catalitza la conversió d' H_2O_2 en aigua i oxigen molecular (IV). La catalasa també juga un paper secundari en la detoxificació de fenols i alcohols (V). És molt efectiva en nivells alts d'estrès oxidatiu i protegeix la cèl·lula de l' H_2O_2 produït al seu interior. S'ha demostrat que la catalasa bloqueja la toxicitat d' $A\beta$ (Behl et al., 1994).



Altres sistemes enzimàtics importants que contribueixen en la defensa antioxidant són el sistema de la tioredoxina, Prx, Grx, també com les glutatió-S-transferases. La tioredoxina (Trx) i la Grx juguen un paper important en la regeneració de proteïnes per la reducció de pont disulfur produït sota condicions d'estrès oxidatiu (Chae et al., 1999). Prx té un paper importat eliminant H_2O_2 generada durant el mecanisme cel·lular utilitzant electrons del Trx. Els nivells proteics de Prx-I i Prx-II estan significativament incrementats en la malaltia d'Alzheimer i confereixen protecció davant la mort neuronal, tot i així Prx-III, que és una proteïna mitocondrial està significativament reduïda d'acord amb el dany mitocondrial (Kim et al., 2001). La glutatió-S-transferasa reacciona amb peròxids orgànics de GSSG i amb els alcohols respectius. La glutatió-S-transfrecrasa és important en la MA i està implicada en la detoxificació de 4-HNE (Goon et al., 1993).

b) Antioxidants no enzimàtics

Les molècules antioxidants com la vitamina E, el 17β -estradiol (E_2) o la melatonina contribueixen a la defensa antioxidant (Isaac et al., 2008). Les propietats antioxidants de la vitamina E, E_2 i la melatonina són degudes a la unió OH a l'anell mesomèric capaç de reaccionar amb els radicals lliures per formar productes innocus.

3. SISTEMA COLINÈRGIC I MALALTIA D'ALZHEIMER

L'estratègia terapèutica basada en la hipòtesi colinèrgica constitueix el principal punt d'intervenció farmacològica en la MA (Minger et al., 2000) (Thathiah and De, 2009). Si bé en un nivell experimental, l'administració d'agonistes muscarínics i nicotínics ha donat lloc a millores de la funció del sistema colinèrgic i a disminucions de la simptomatologia associada a la MA (Dani, 2001; Fisher et al., 2003; Lazareno et al., 2002; Woodruff-Pak and Santos, 2000). Tanmateix, els IACHÉ, representen actualment l'estratègia terapèutica que millors resultats ha

proporcionat. A continuació es discuteix de forma detallada el paper de les diferents dianes colinèrgiques en el tractament de la MA.

3.1 Els receptors muscarínics

S'han descrit cinc tipus de receptors muscarínics, del M1 al M5, tots ells del tipus metabotròpic acoblats a proteïnes G amb una localització i una funció específiques (fig. 12)(Rang et al., 2003a). Dels cinc subtipus de receptors muscarínics, els M2 i els M3 participen en la major part de les respostes perifèriques, malgrat els M2 es localitzen també al nivell central. Els receptors M1 són els més abundants en el sistema nerviós central. Aquests receptors es troben localitzats preferentment en el neocòrtex, l'hipocamp, la substància nigra i l'estriat en particular i en àrees cerebrals associades a processos de memòria i cognició en general. Això ha potenciat la cerca de fàrmacs agonistes amb un elevat índex de selectivitat enfront dels receptors muscarínics M₁ (Bartolomeo et al., 2000; Lazareno et al., 2002).

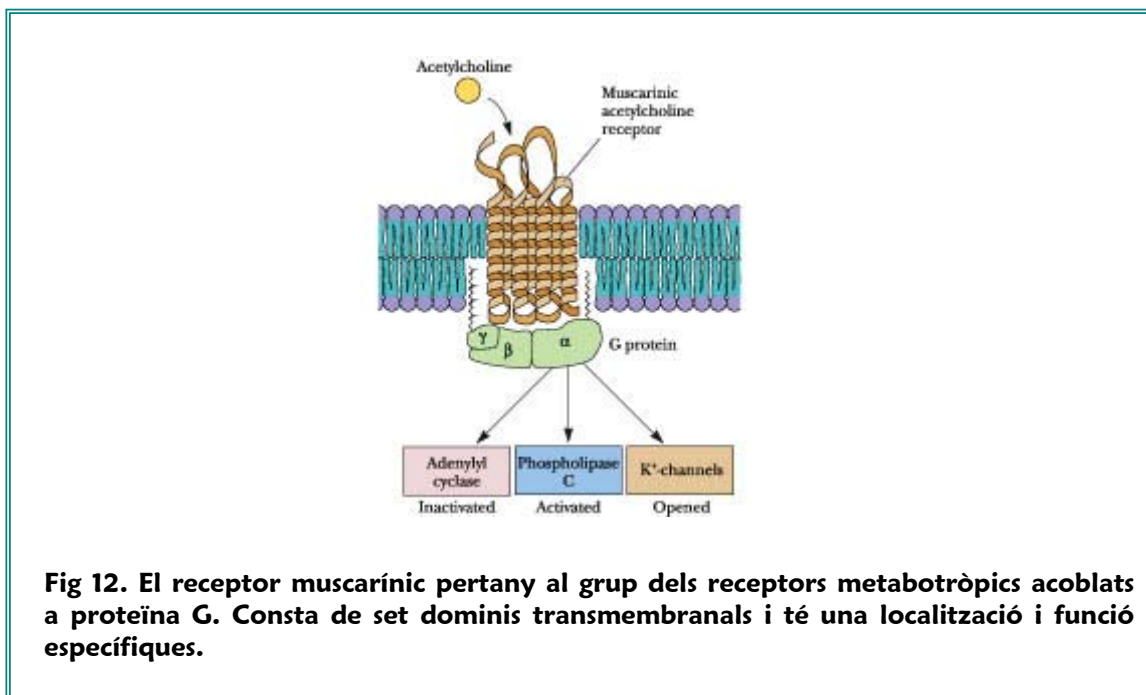


Fig 12. El receptor muscarínic pertany al grup dels receptors metabotròpics acoblats a proteïna G. Consta de set dominis transmembranals i té una localització i funció específiques.

Mentre els receptors M1 són majoritàriament de tipus presinàptic i estimulen l'alliberació de diferents neurotransmissors, els receptors de tipus M2 que actuen com autoreceptors, estan localitzats a un nivell presinàptic i exerceixen un efecte de retroalimentació negativa sobre l'alliberament d'ACh (Bartolomeo et al., 2000; Rang et al., 2003a). La distribució de la resta de receptors muscarínics sembla que és més limitada i que les seves funcions no són tan conegudes.

En la malaltia d'Alzheimer els receptors M1 es mantenen inalterats, mentre que els receptors M2, sobretot en l'àmbit frontal, mostren una reducció significativa quant al nombre (Dekosky and López, 1998). Per contra, s'ha observat que alguns pacients amb MA, de manera excepcional, mostren una sobreexpressió dels receptors muscarínics M2 al còrtex frontal i el còrtex temporal (Lai et al., 2001). En aquests casos s'ha descrit una simptomatologia psiquiàtrica associada a la malaltia. Com a conseqüència de l'administració d'antagonistes muscarínics M2 poden reduir la simptomatologia psicòtica en aquests pacient (Bodick et al., 1997).

Els receptors M1 s'han relacionat amb els tres aspectes més rellevants en la fisiopatologia de la MA: a) la deposició del pèptid β A (Pakaski and Kalman, 2008); b) la hiperfosforilació de la proteïna τ i posterior formació de cabdells neurofibril·les i c) la pèrdua de la funció cognitiva per alteració colinèrgica (Fisher et al., 2003; Login, 1997). Així, s'ha demostrat que els agonistes M1 incrementen la secreció de l'APP degut a l'activació de la α -secretasa i la inhibició de la via de la γ -secretasa, reduint d'aquesta manera la formació de β A, millorant la funció cognitiva en models animals (Fisher et al., 2000; Fisher et al., 2003). Els agonistes M1, poden, també, inhibir l'activitat neurotòxica de la β A bloquejant la capacitat que té dita proteïna per activar enzims relacionats amb importants funcions cel·lulars i que poden induir la mort neuronal (Fisher et al., 2003; Gu et al., 2003; Hock et al., 2003) (Fisher, 2008a).

Existeix un nou grup de fàrmacs al·lostèrics que s'uneixen en un lloc diferent del de l'ACh en el receptor muscarínic, incrementant l'afinitat o l'eficàcia del neurotransmissor per aquest receptor muscarínic (Lazareno et al., 2002). Malgrat això, l'eficiència real dels agonistes muscarínics en els pacients de MA queda per determinar (Messer, Jr., 2002).

A més a més dels agonistes muscarínics M1, els antagonistes dels receptors M2 presinàptics podrien, així mateix, representar una opció terapèutica per al tractament de la MA atès que el bloqueig de l'activitat d'aquests autoreceptors dóna lloc a un increment en l'alliberació d'ACh. S'ha observat, en estudis in vivo (Lachowicz et al., 2001), que el compost SCH 72788 indueix un increment de l'alliberació d'ACh en cultius cel·lulars de cèl·lules ovàriques d'hàmsster (CHOK) que expressen receptors muscarínics M2 humans. Això suggereix que els antagonistes muscarínics M2 podrien representar una opció terapèutica adequada en el tractament del declivi cognitiu observat en la MA.

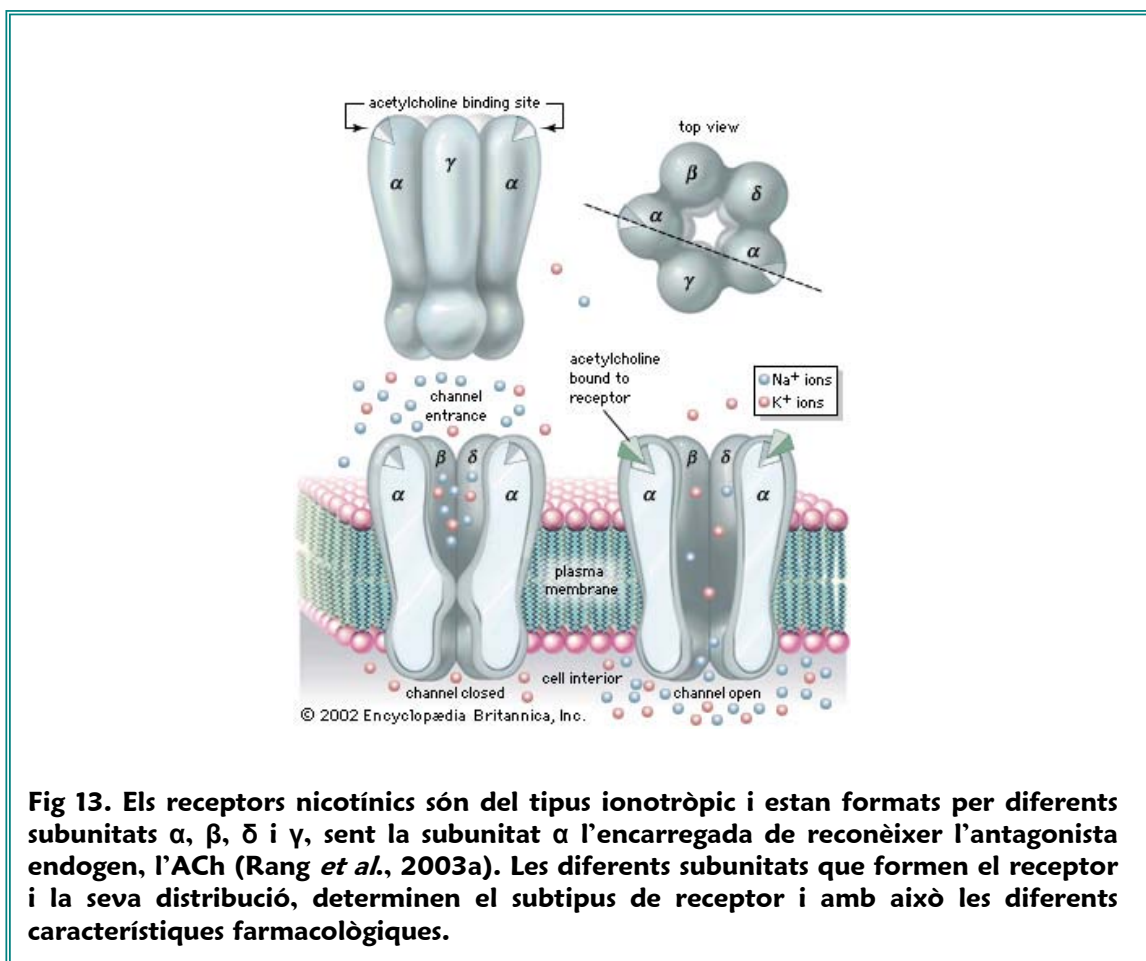
Un altre fet que recolza la importància dels receptors muscarínics en la MA és que l'administració de certs fàrmacs amb activitat antimuscarínica, com els que prescriuen en la malaltia de Parkinson per al control dels tremolors, poden induir l'aparició de signes de demència en malalts (Perry et al., 2003). Es creu en la possibilitat que l'administració d'aquests fàrmacs en pacients de Parkinson, pot incrementar la deposició de plaques senils (Perry et al., 2003).

3.2 Els receptors nicotínics

Els receptors nicotínics (fig. 13) són del tipus ionotròpic i estan formats per diferents subunitats α , β , δ i γ , sent la subunitat α l'encarregada de reconèixer l'antagonista endogen, l'ACh (Rang et al., 2003a). Les diferents subunitats que formen el receptor i la seva distribució, determinen el subtipus de receptor i amb això les diferents característiques farmacològiques.

En l'àmbit del sistema nerviós central, els receptors nicotínic es troben àmpliament distribuïts i malgrat que se'n coneix la localització i s'han pogut caracteritzar diferents tipus de receptors, en queda encara per determinar de forma més detallada la importància en la neurotransmissió colinèrgica i en altres processos neuronals. Si bé colocalitzen tant presinàpticament com postsinàptica, en tots els casos els receptors nicotínic afavoreixen l'alliberació del neurotransmissor a l'espai sinàptic. En la MA s'ha observat que el nombre de receptors nicotínic es redueix de forma significativa sigui quina en sigui la localització (Benzi and Moretti, 1998).

Hi ha nombroses dades relacionades amb els receptors nicotínic i el seu paper en desordres neurodegeneratius (Martin-Ruiz et al., 1999; Pauly, 1999; Woodruff-Pak and Santos, 2000) (Buckingham et al., 2009).



Així, en determinacions postmortem (Levin and Rezvani, 2002), s'ha establert de forma clara la disminució de receptors nicotínics en pacients amb MA, malaltia de Parkinson i altra classe de demències. A més a més, estudis experimentals fets en cultius cel·lulars han demostrat la capacitat neuroprotectora dels receptors nicotínics, efecte que sembla estar mediat pel receptor nicotínic tipus $\alpha 7$ (Dani et al., 2004; Dajas-Bailador et al., 2003; O'Neill et al., 2002). Diversos grups han observat un efecte neuroprotector per nicotina en cultius primaris de neurones corticals de cervell i estriat (Donnelly-Roberts et al., 1996; Minana et al., 1998). Aquests efectes neuroprotectors es van revertir totalment o parcialment en presència d'inhibidors dels receptors nicotínics com la mecamilamina o l'hexametoni. La protecció induïda pels agonistes nicotínics és concentració i temps dependent.

Atesa la rellevant funció d'aquests receptors en els processos de neurotransmissió i en l'activitat del sistema colinèrgic, s'han desenvolupat nous compostos amb la finalitat d'obtenir alternatives terapèutiques pel tractament de la MA (la relació entre els receptors nicotínics $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ en mecanismes de memòria, està àmpliament demostrada (Hogg and Bertrand, 2004). En aquest sentit, l'estudi de compostos al·lostèrics dels receptors nicotínics amb la fi de potenciar l'acció de l'ACh sobre el receptor, sembla que ofereix noves possibilitats terapèutiques (Taly et al., 2009). Malgrat existeixen diferents compostos que han demostrat que donen lloc a un efecte al·lostèric sobre els receptors nicotínics (Krause et al., 1998; Zwart et al., 2000; Zwart and Vijverberg, 1997), els IACHe continuen sent els fàrmacs d'elecció en aquest aspecte. Així la galantamina (Geerts et al., 2002), o el nefiracetam (Campos et al., 1998; Narahashi et al., 2003), un nou fàrmac dissenyat pel tractament de la MA i altres demències, augmenten l'eficàcia de la resposta del receptor nicotínic a l'estímul de l'ACh. Això es posa de manifest amb un increment del nombre de despolaritzacions induïdes per l'agonista endogen (ACh) i en el nombre d'obertures del canal de dit receptor (Dajas-Bailador et al., 2003).

Els tractaments experimentals basats en l'administració de fàrmac que potencien l'activitat nicotínica, milloren clarament la disfunció cognitiva observada en la MA. L'ús d'aquests fàrmacs en altres malalties de similars, en alguns aspectes de la MA, tals com l'esquizofrènia, el dèficit atencional i el desordre hiperactiu, també han induït una millora en la simptomatologia (Levin and Rezvani, 2002).

A tot això cal afegir que l'estimulació dels receptors nicotínics també està relacionada amb una disminució dels dipòsits de plaques senils al SNC, i bloqueja, de manera indirecta, l'acció de la γ -secretasa (Utsuki et al., 2002).

3.3 Colinesterases

En els vertebrats hi ha dos tipus principals de colinesterases (ChE), l'AChE i la butirilcolinesterasa (BChE). Ambdues són similars en la seva estructura molecular, però presenten diferent distribució, especificada de substrat i funcions. Els dos tipus consten de subunitats catalítiques globulars que constitueixen les formes solubles que es troben al plasma (la BChE) i el líquid cefaloraquídi (la AChE). En altres zones, les unitats catalítiques de l'AChE, estan unides a proteïnes de tipus col·lagen o glicoproteïnes, mitjançant les quals es fixen a la membrana cel·lular o a la membrana basal (Rang et al., 2003a).

En les sinapsis colinèrgiques, l'AChE es pot trobar fixada tant a la membrana basal de la fenedura sinàptica com en forma soluble, i té com a funció hidrolitzar l'ACh alliberada. La forma soluble també es troba present en el plasma (Tayebati et al., 2002), i la forma fixada a la membrana, en els eritròcits, on exerceix una funció encara desconeguda.

La BChE té una àmplia distribució i es troba en teixits com el fetge, el cervell, el múscul llis gastrointestinal i el plasma. És menys específica quant al substrat que l'AChE i la seva funció no és del tot coneguda malgrat que actualment es creu que el seu paper ha estat infravalorat en considerar que la seva inhibició tan sols

produïa efectes colinèrgics perifèrics. Recentment s'ha provat que la BChE té, a més a més, una important funció en la hidròlisi de l'ACh en el SNC, la qual cosa podria conferir a aquest enzim un paper molt més ampli en la neurotransmissió colinèrgica del que es va pensar inicialment (Geula and Darvesh, 2004).

Se sap que el locus actiu de l'ACHÉ conté una serina activa que és part d'una tríade catalítica, Glu-His-Ser que no és accessible directament des de la superfície de la proteïna sinó que està situat a uns 20 Å de profunditat, al final d'una llarga i estreta cavitat denominada *gorja catalítica* (Szegletes et al., 1998; Szegletes et al., 1999). Considerant que l'ACHÉ és un dels enzims més ràpids que es coneixen (Mendelson et al., 1998), aquest fet és sorprenent ja que semblaria que limitaria el pas de substrats.

L'ACHÉ i la BChE difereixen en el volum dels llocs catalític on s'acomoda el substrat, sent més gran en el cas de la BChE, la qual cosa explicaria el fet que l'ACHÉ hidrolitzi ACh però no la butirilcolina (BCh), mentre que la BChE pot hidrolitzar ambdós substrats així com diversos esters més.

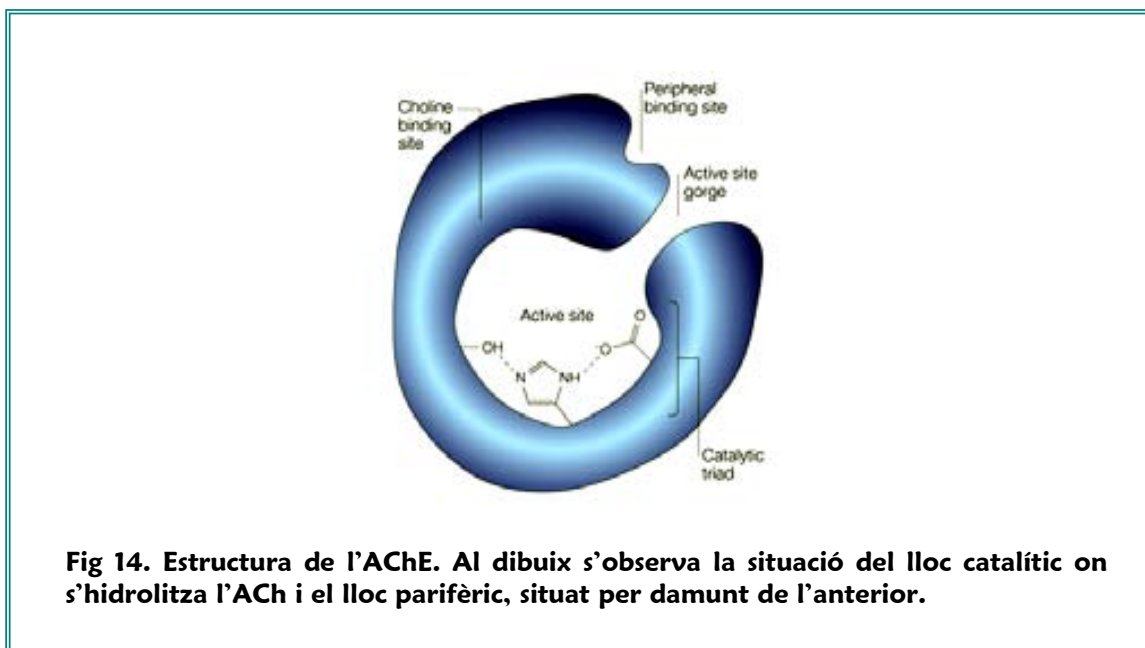
L'ACHÉ i la BChE pertanyen al grup d'enzims de les serines hidrolases. El lloc catalític (fig. 14) de l'ACHÉ té dues regions diferents: una d'aniònica, que posseeix un residu glutamat, i una d'esteràsica, amb un grup imidazole de l'histidina i un OH⁻ de la serina, deixant l'enzim acetilat i una molècula lliure de colina. La hidròlisi espontània del grup acetil-serina es produeix ràpidament. Els IACHÉ tenen grups bàsics que es fixen al lloc aniònic de l'enzim mentre que altres grups poden fixar-se al lloc esteràsic. L'ACHÉ hidrolitza també els IACHÉ però a una velocitat molt lenta de l'ordre de minuts, hores, dies o fins i tot setmanes en funció del compost, sent aquesta la base per la seva classificació, en comparació amb la velocitat d'hidròlisi de l'ACh que té lloc en mil·lisegons.

Hi ha inhibidors, com el propidium i la toxina fasciculina, que no penetren al lloc catalític sinó que s'uneixen al lloc perifèric localitzat a l'entrada de la gorja

catalítica (fig. 14). Finalment, alguns inhibidors s'uneixen simultàniament al lloc catalític i al perifèric com per exemple el compost bisquaternari BW284c51.

Ambdós llocs de l'enzim posseeixen residus que contribueixen de forma important a la unió dels lligands.

S'han descrit nombroses isoformes de l'AChE, i és la forma globular tetramèrica G4 unida a membrana la que predomina al cervell (80 %); a més a més, hi ha una petita quantitat de la forma monomèrica G1. En la MA es dóna una pèrdua selectiva de la forma G4 en zones de l'escorça cerebral i l'hipocamp, que indueix una alteració en la proporció de ambdues isoformes i dóna lloc a un predomini de la forma G1 (Siek et al., 1990).



Sembla que en el procés normal d'envelliment no hi ha una disminució significativa en l'activitat de l'AChE en l'escorça cerebral. Tanmateix, en pacients amb MA sí que existeix una disminució important en la concentració d'AChE; a més, la proporció AChE/BChE es veu, a si mateixa, alterada durant el progrés de la malaltia. S'ha comprovat la presència d'una correlació positiva entre la pèrdua d'activitat de l'AChE i la gravetat de la demència (Ibach and Haen, 2004). En la

MA l'activitat de l'AChE disminueix fins a nivells tan baixos com el 10-15 % dels valors normals, mentre que la BChE és manté inalterada o fins i tot incrementa la seva activitat fins a un 20 % (Arendt et al., 1992).

D'una altra banda, s'ha observat que en cervells humans i en els ratolins transgènics modificats, (Munoz and Inestrosa, 1999) juntament amb la β A, s'ha demostrat que l'AChE accelera la formació de les plaques senils i aquest efecte sembla que està directament relacionat amb l'activació de l'anomenat lloc perifèric localitzat per damunt del lloc actiu (Inestrosa et al., 1996; Munoz and Inestrosa, 1999). Aquesta acció no colinèrgica implica que a l'AChE se l'hagi associat un potencial de citotoxicitat tant sobre les cèl·lules glials com sobre les neuronals. L'observació de la condensació cromosòmica en presència de determinades concentracions d'AChE purificada, i en diferents condicions indica que la mort cel·lular per apoptosi també és resultat de l'acció de l'AChE (Calderon et al., 1998).

Tenint en compte que les plaques senils estan compostes principalment per β A1-40 i β A1-42 s'ha estudiat també com aquest factor pot influir en l'activitat proamiloidogènica de l'AChE. Sembla que els agregats formats per β A1-42 incrementen la seva capacitat neurotoxicà en presència de l'AChE i la citotoxicitat produïda pels agregats de β A1-40 depenent de la concentració de l'AChE unida al complex, de tal manera que com més gran sigui la concentració de l'enzim més tòxics seran els complexos (Munoz and Inestrosa, 1999).

Si bé l'ús dels IACHÉ en la teràpia farmacològica de la MA suposa només una millora simptomàtica, s'ha demostrat que el seu ús proporciona notable benefici a malalts d'Alzheimer.

D'altra banda, es coneix que l'eficàcia dels IACHÉ en el tractament de la MA sembla que no està únicament relacionada amb la seva activitat com a inhibidors de l'enzim AChE (Narahashi et al., 2003), en conseqüència, la funció d'aquests

fàrmacs s'analitza actualment sota tres aspectes: a) la seva activitat anticolinesteràsica, b) la seva activitat al·lostèrica sobre els receptors nicotínics i c) la seva capacitat de bloquejar el lloc perifèric que intervé en el procés d'agregació de la proteïna β A.

3.4 Relació de les proteïnes amiloides amb l'acetilcolinesterasa

L'acumulació de la proteïna β A i la formació de plaques senils (fig. 15) estan directament relacionades amb la gravetat de la demència que presenten els pacients. La cascada de processament de l'APP pot donar lloc a la producció de la proteïna β A1-42, que és el fragment de la β A amb una major toxicitat i el principal component de les plaques senils (Dekosky and López, 1998). El bloqueig de la producció de la β A1-42 és, per aquest motiu, un objectiu interessant amb un potencial terapèutic elevat en la MA.

Com s'ha comentat anteriorment, es coneixen com a mínim tres enzims (α , β i γ secretasa) relacionats amb el processament de l'APP (Dekosky and López, 1998). Teòricament, els inhibidors de la β i la γ -secretasa podrien reduir la producció dels dipòsits de la proteïna β A (Hooper and Turner, 2002); no obstant això, és molt probable que aquests enzims posseïxin altres substratctes addicionals, que en limiten la utilització.

A més a més, el bloqueig de la formació de les plaques mitjançant la inhibició de l'enzim que intervé en la formació de la proteïna β A, l'ús d'anticossos específics per bloquejar l'activitat patològica de la proteïna sembla que és una opció terapèutica (Bard et al., 2000; Helmuth, 2000) (Lemere, 2009). S'ha demostrat que la immunització en ratolins transgènics que sobreexpressen una de les formes mutants associades a la MA de l'APP humana disminueix la formació de plaques i indueix l'eliminació de les ja existents (Bard et al., 2000; Broymann and Malter, 2004). En aquest mecanisme estaria implicada l'activació de les cèl·lules de la

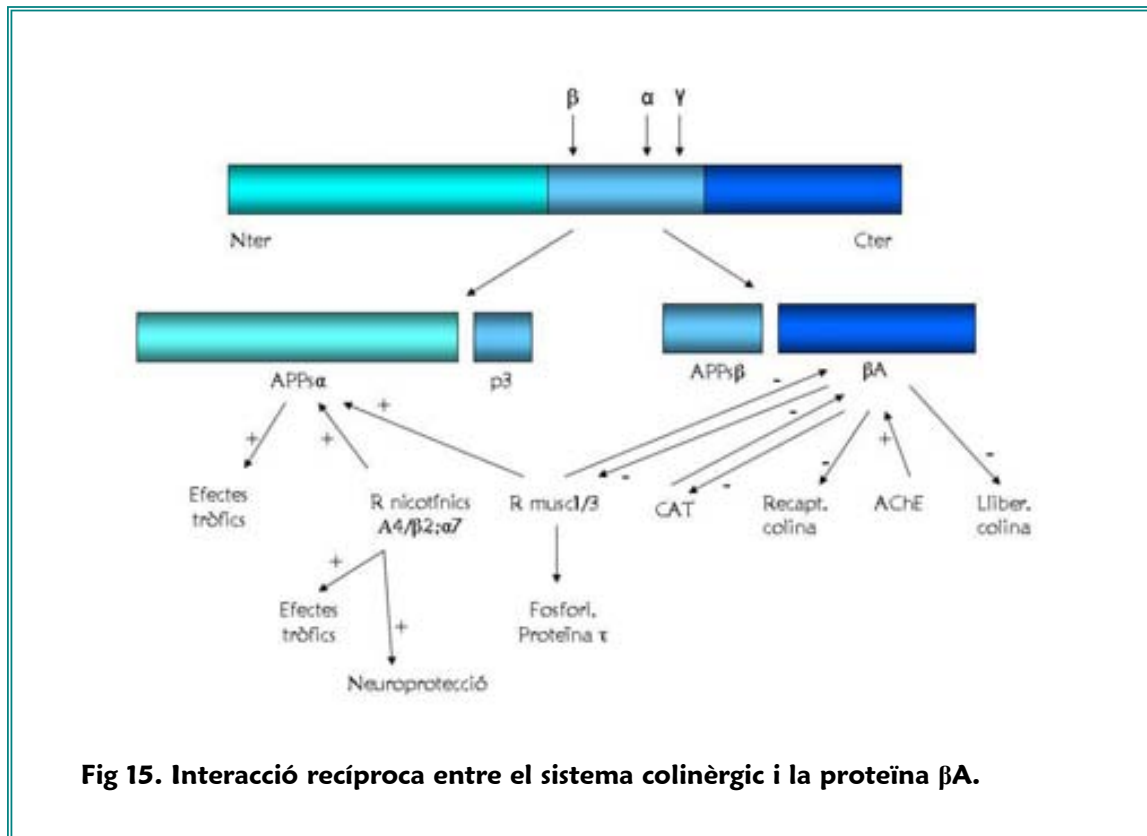
micròglia per part dels anticossos davant la proteïna β A (Dudal et al., 2004; Ferrer et al., 2004). Els assajos clínics amb pacients humans que havien desenvolupat en un grau moderat la MA, no van mostrar cap reacció adversa significativa a la fase I, mentre que es van observar alguns casos (5 %) de reacció inflamatòria del SNC (meningoencefalitis asèptica) durant la fase II (Nicoll et al., 2003). Els esforços per desenvolupar una vacuna per la MA basada en l'administració d'anticossos contra la β A han donat, d'una banda, resultats controvertits (Monsonogo and Weiner, 2003; Morgan et al., 2000; Weiner and Selkoe, 2002).

Existeixen nombroses dades bibliogràfiques que relacionen directament l'activitat dels receptors nicotínics i muscarínics així com la de l'AChE amb canvis en la capacitat neurotòxica de la β A.

Els agonistes nicotínics (fig. 15) atenuen la toxicitat induïda per la proteïna β A en cultius neuronals, efecte que sembla que està mitjançat pels receptors nicotínics (Liu and Zhao, 2004). La tacrina ha provat ser capaç d'atenuar la toxicitat induïda per la β A₂₅₋₃₅ en cultius cel·lulars mitjançant un mecanisme que sembla que està relacionat amb receptors nicotínics (Svensson, 2000). Així mateix, la huperzina A ha mostrat que posseeix la capacitat de disminuir la toxicitat induïda per la β A₁₋₄₀ in vivo, reduint la pèrdua de CAT i la neurodegeneració cel·lular (Wang et al., 2001).

Una altra manera d'influir sobre el processament de la proteïna β A és l'ús dels agonistes muscarínics (fig. 15), per activar directament aquests receptors i els IACHÉ mitjançant un mecanisme d'acció indirecte, a través de la regulació del processament i la secreció de l'APP (Caccamo et al., 2009; Fisher et al., 2003). Així, l'estimulació colinèrgica dels receptors muscarínics M1 i M2 produeix un augment en la secreció d'APP in vitro (Qiu et al., 2003) i la inhibició a llarg termini de les ChE sembla que potencia el processament normal de l'APP en el cervell de pacients amb MA, a causa de l'augment dels nivells sinàptics d'ACh

(Giacobini and Becker, 2004) i del fet que s'ha observat que l'activitat dels IChE, com la tacrina i la fisoestigmina, incrementen l'alliberament de l'APP (Mori et al., 1995).



S'ha observat que l'enzim AChE (fig. 15) es troba present als dipòsits de proteïna β A en la MA (Alvarez et al., 1998). Sembla clar que l'enzim AChE pot accelerar la formació de la proteïna β A com un agent amiloigogènic potent (Inestrosa et al., 1996), i jugar un paper molt important en la seva deposició en cervells de pacients amb MA, fet que està relacionat amb l'activació del lloc perifèric de l'enzim (Campos et al., 1998; De Ferrari et al., 2001). Això implica que la inhibició del lloc perifèric de l'enzim podria disminuir la deposició de la proteïna β A i, per tant, la formació de plaques senils, cosa que conduiria a frenar la progressió de la malaltia.

En aquest sentit, la utilització de lligands capaços d'interactuar simultàniament amb el lloc catalític i el lloc perifèric, suposarien un avantatge sobre l'ús de qualsevol altre inhibidor de l'AChE conegut. Aquests lligands d'acció dual presentarien una major potència inhibidora sobre l'enzim per raó de la seva major afinitat per l'enzim i, en conseqüència, per una major eficiència en el tractament de la simptomatologia de la MA i la seva major capacitat per retardar el procés de neurodegeneració.

4. FÀRMACS INHIBIDORS DE L'ACETILCOLINESTERASA

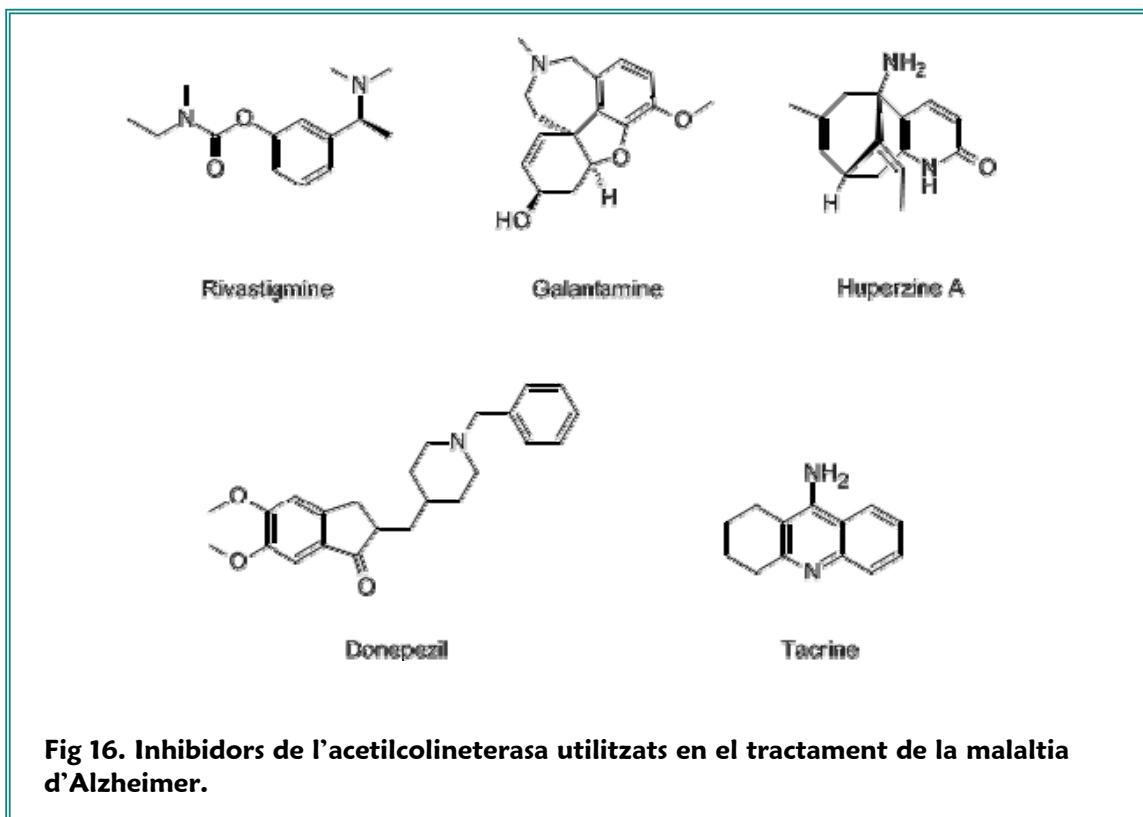
4.1 Anticolinesteràsics principals utilitzats en el tractament de la malaltia d'Alzheimer

Actualment els IChE representen l'aproximació terapèutica més estudiada i la que ha proporcionat els únics fàrmacs admesos per les agències de medicaments per al tractament de la MA: la tacrina (Cognex ®), el donepezil (Aricept ®), la rivastigmina (Exelon ®) i la galantamina (Reminyl ®) (fig. 16)(Alzheimer's association, 2003). Cal destacar que entre els diferents IChE que es troben en fase d'estudi també hi ha la huperzina A, un alcaloide natural que s'extreu del licopodi *Huperzia serrata*. La huperzina A ha estat utilitzada en medicina tradicional xinesa durant molt de temps pels seus efectes beneficiosos sobre les funcions cognitives (Tang et al., 1989).

La tacrina 1,2,3,4-tetrahidrocanabinol-9-aminocridina, va ser el primer fàrmac aprovat per al tractament de la MA. S'ha demostrat que aquest compost facilita els processos de memòria en pacients amb MA; tanmateix, calen dosis elevades per a la seva eficàcia terapèutica. Això, juntament amb el fet que la tacrina inhibeix per igual l'AChE i la BChE, i la seva pauta d'administració (quatre vegades al dia) fa que es presentin factors indesitjables importants (alteracions gastrointestinals i

hepatotoxicitat) que són responsables de l'ús limitat d'aquest fàrmac (Pang et al., 1996).

S'ha demostrat que la tacrina, a més a més d'actuar com IACHÉ, interacciona amb els receptors muscarínics, i presenta una afinitat molt similar pels tipus M1 i M2 (Svensson and Nordberg, 1996; Zhao and Tang, 2002). Entre els receptors muscarínics, el subtipus M1 té un paper especialment important en la MA per la seva relació amb les alteracions patològiques més importants de la malaltia (Birdsall and Nathanson, 2001); (Bodick et al., 1997; Login, 1997). L'activació d'aquest receptor per part de la tacrina (DeBoer and Abercrombie, 1996) incrementa la secreció de l'APP via activació de la α -secretasa, disminueix la formació de la β A mitjançant la inhibició de la γ -secretasa i inhibeix l'efecte negatiu de l'estrès oxidatiu responsable, també de la mort cel·lular (Fisher et al., 2003).



S'ha pogut observar també que després de l'administració de tacrina a pacients amb MA es produeix un increment en la densitat de receptors nicotínics (Nordberg et al., 1992). A part d'aquest efecte sobre els receptors nicotínics alguns autors han demostrat la capacitat de la tacrina per potenciar de forma al·lostèrica el citat receptor (Zwart et al., 2000), tanmateix en aquest punt hi ha molta controvèrsia.

El donepezil és una benzilpiperacina que ha desplaçat el seu ús per la tacrina. Així mateix és un inhibidor reversible de l'ACHé però amb una acció més selectiva; així, es disminueix el seu efecte sobre la BChE (Ruiz-Nuño et al., 1998). Les seves característiques farmacològiques fa que presenti anys efectes indesitjables i el seu temps mitjà d'eliminació fa que només calgui una administració al dia del fàrmac (Arenas and Gou, 1998). Resultats experimentals han demostrat que el donepezil activa de forma directa els receptors nicotínics (Zhang et al., 2004) de manera que pot tenir interès per la relació que l'activació d'aquests receptors té amb els efectes neuroprotectors i tròfics sobre la població neuronal (De Ferrari et al., 2001)

La rivastigmina pertany al grup dels carbamats els quals inhibeixen l'ACHé unint-se directament al lloc actiu amb una cinètica reversible lenta, actuant durant un temps aproximat de deu hores (l'ACHé d'acció mitja). S'ha observat que el mode d'acció i el metabolisme de la rivastigmina fan poc probable les interaccions amb altres fàrmacs, la qual cosa té un interès especial en pacients d'edat avançada atès que acostumen a rebre tractaments farmacològics concomitants. Els efectes adversos tenen lloc en l'àmbit gastrointestinal i desapareixen amb l'administració successiva del fàrmac (Salud, 1999).

La galatamina és un alcaloide terciari obtingut actualment per síntesi, però originàriament derivat dels bulbs del lliri de neu (*Galanthus nivalis*) i de diverses espècies de narcisos. Aquest compost és menys potent que la tacrina però a la vegada mostra menys efectes indesitjables. La galatamina augmenta la disponibilitat sinàptica de l'ACh inhibint de forma competitiva i reversible l'ACHé (Bores et al., 1996). La seva selectivitat per l'ACHé és 50 vegades superior que per

la BChE (Thomsen et al., 1991). La galantamina pot, així mateix, potenciar la resposta de l'ACh (Maelicke et al., 2001). El receptor nicotínic presinàptic es fa més sensible a l'ACh i s'amplifica la resposta. Els moduladors al·lostèrics dels receptors nicotínics, com és el cas de la galantamina, eviten el problema de la desestabilització dels receptors nicotínics induïda pels agonistes nicotínics i, en conseqüència, el desenvolupament de la tolerància i la disminució de l'eficàcia clíniques (Samochocki et al., 2003).

La galantamina prevé l'apoptosi induïda per la taspigargina (un inhibidor irreversible de la bomba ATPasa calci dependent del reticle endoplasmàtic, mitjançant un efecte neuroprotector que sembla que està associat amb els receptors $\alpha 7$ i de la proteïna antiapoptòtica BCl-2).

També en relació amb la seva capacitat neuroprotectora, s'ha observat que el tractament amb NGF o galantamina, prevenia o millorava el progrés neurodegeneratiu secundari al dèficit de NGF (Capsoni et al., 2002). Així mateix, en rates sotmeses a isquèmia cerebral global amb reperfussió, s'ha descrit que el tractament postisquèmic amb galantamina va permetre la recuperació de la capacitat d'aprenentatge respecte dels animals no tractats (Iliev et al., 2000).

Com s'ha posat de manifest, la galantamina presenta una acció rellevant sobre els receptors nicotínics, però s'ha pogut observar que no indueix cap resposta en interaccionar amb els receptors muscarínics (Samochocki et al., 2003). Aquest efecte s'ha observat en cinc línies cel·lulars cadascuna d'elles expressant un dels cinc tipus de receptors muscarínics (M1-M5), confirmant-se que la galantamina no alterava l'activitat de cap d'ells (Samochocki et al., 2003).

La huperzina A, és una amina d'origen natural (Tang and Han, 1999), que s'extreu del licopodi *Huperzia serrata*, utilitzada a la Xina durant molts anys per al tractament de diverses malalties. Es tracta d'un inhibidor reversible, potent i selectiu de l'AChE, que s'absorbeix ràpidament i que penetra amb facilitat en el

SNC. En comparació amb la tacrina o el donepezil, l'huperzina A té un temps d'acció més gran i un índex terapèutic millor (Tang and Han, 1999). A més a més indueix efectes colinèrgics perifèrics importants a dosis terapèutiques. Una de les característiques més destacables és que aquest compost redueix la mort neuronal induïda per glutamat (Zangara, 2003) i així mostra un efecte neuroprotector.

La potenciació a llarg termini és una forma de plasticitat sinàptica perllongada en el temps la qual es creu que és un model simple de certa forma d'aprenentatge i memòria (Bliss and Collingridge, 1993). La seva inducció, en la regió hipocampal CA1, es du a terme a través de vies glutamatèrgiques, especialment a través dels receptors del NMDA (Collingridge, 1985), malgrat que també està modulada per l'acció de l'ACh (Hirotzu et al., 1989) i el GABA (Wigstrom and Gustafsson, 1985). Després de la l'administració del fragment β A₃₁₋₃₅ (fragment que pertany al domini actiu de la β A) (Pike et al., 1995) s'observa una marcada supressió de la potenciació a llarg termini de la regió CA1 a l'hipocamp. Aquest efecte va ser marcadament revertit gràcies a la presència de la (-)huperzina A, que mostra així una capacitat neuroprotectora enfront de l'activitat del pèptid β A (Ye and Qiao, 1999).

A més a més, la huperzina A també mostra un efecte neuroprotector davant l'activitat oxidant del peròxid d'hidrogen (Xiao et al., 1999), que la relaciona amb la capacitat de prevenció del dany oxidatiu que es produeix a la MA. S'ha observat que l'efecte neuroprotector de la huperzina A produeix una millora en els processos cognitius de pacients enfront de l'activitat oxidant d'un altre fragment del β A, el fragment β A₂₅₋₃₅ (Xiao et al., 2000a). Això conclou que la huperzina A mostra un efecte neuroprotector significatiu enfront de l'activitat tòxica que el β A indueix sobre les neurones, molt probablement a través d'una activitat antioxidant.

S'han fet molts pocs estudis relacionats amb l'activitat directa de la huperzina A sobre els receptors colinèrgics. Pels resultats obtinguts es pot considerar la

huperzina A com un IChE pur ja que poc o cap efecte té aquest fàrmac ni sobre els receptors muscarínics (Alcala et al., 2003a) ni sobre els nicotínics (Fayuk and Yakel, 2004).

4.2 Evidències dels efectes neuroprotectors dels inhibidors de l'ACHÉ

En els darrers anys, l'ús d'aquests quatre inhibidors de l'ACHÉ i la popularitat de la hipòtesi colinèrgica, en general, ha experimentat una sèrie de daltabaixos (Pepeu and Giovannini, 2009). Aquests fàrmacs constitueixen la medicació més efectiva per la millora a curt termini (sis a dotze mesos) de l'activitat cognitiva i funcional i presenten perfils de seguretat i tolerabilitat favorables (Ibach and Haen, 2004). Tanmateix, s'ha criticat que els resultats globals són generalment modestos, i afecten només una tercera part dels pacients tractats i que l'ús d'aquests fàrmacs va acompanyat de freqüents, malgrat suaus, efectes secundaris gastrointestinals de tipus colinèrgic (Giacobini, 1998). Però l'objecció principal a l'ús d'aquests fàrmacs és que sempre han estat tractats com a tractament merament simptomàtic de la MA, en contraposició a les teràpies dirigides a β A, de les quals s'espera un paper modificador de la malaltia.

Tanmateix, nombrosos estudis preclínic, radiològics i clínics han evidenciat efectes neuroprotectors associats a l'ús dels inhibidors de l'ACHÉ, que apunten a un paper modificador de la malaltia per part d'aquests fàrmacs.

Nombrosos estudis preclínic han demostrat que els quatre inhibidors de l'ACHÉ utilitzats pel tractament de la MA i, en particular, el donepezil, amb el qual s'han dut a terme la major part d'estudis, presenten algun tipus d'efecte neuroprotector en assajos in vitro o in vivo enfront d'una gran varietat d'estímuls neurotòxics. Així, s'han descrit efectes neuroprotectors d'aquests fàrmacs enfront de la toxicitat induïda pel glutamat (Akaike, 2006; Riepe, 2005; Takada et al., 2003; Takada-Takatori et al., 2006) o NMDA (Akasofu et al., 2006) normalment en cultius

primaris de neurones corticals de rata, davant la toxicitat induïda per β A en cultius primaris de neurones colinèrgiques septals de rata (Kimura et al., 2005b; Kimura et al., 2005a), en cèl·lules SH-SY5Y (Modrego, 2006) o en ratolins (Meunier et al., 2006b) o enfront altres agents neurotòxics com el peròxid d'hidrogen (Zhang and Tang, 2000) o el monòxid de carboni (Meunier et al., 2006a). Així mateix, s'han descrit efectes neuroprotectors d'aquests fàrmacs en models de dany neuronal induït per privació d'oxigen i glucosa (Akaike, 2006; Riepe, 2005; Sobrado et al., 2004; Zhou et al., 2001).

Anàlogament, hi ha evidències clíniques creixents que suggereixen un efecte modificador de la malaltia pels inhibidors de l'AChE, que sembla que tenen efectes prolongats i sostinguts durant el temps (Sabbagh et al., 2006). Un estudi recent de dades d'assajos clínics a llarg termini (rivastigmina i donepezil fins als cinc anys, galantamina fins a quatre anys) suggereixen un alentiment del tractament, malgrat la no-interrupció del deteriorament cognitiu amb inhibidors de l'AChE (Bullock and Dengiz, 2005).

Amb la finalitat d'obtenir dades que permetin distingir entre efectes simptomàtics i efectes modificadors de la malaltia en pacients amb MA tractats amb inhibidors de l'AChE, s'han dissenyat dos tipus d'assajos específics (Mori et al., 2006). El primer es basa en l'assumpció que els beneficis obtinguts durant el tractament amb un fàrmac modificador de la malaltia s'haurien de mantenir en comparació amb els controls si s'interromp aquest tractament en un moment determinat per l'assaig clínic. Pel contrari, si els efectes del fàrmac fossin purament simptomàtics, qualsevol millora cognitiva associada al seu ús desapareixeria immediatament després de la seva retirada. El segon tipus d'assaig inclou una primera fase doble cec seguida d'una fase d'extensió, en la qual als pacients que rebien placebo se'ls començava a administrar el fàrmac modificador de la malaltia. Si els pacients que prenen placebo durant la primera fase assolien immediatament els beneficis observats en el grup tractat des del començament de l'assaig, l'efecte hauria de ser simptomàtic, mentre que si es produïa un deteriorament en l'interval en què no es

rebia tractament actiu, aquest grup no podia assolir als que prenién tractament actiu des del començament. En ambdós tipus d'assaig s'han obtingut resultats atribuïbles a un efecte modificador de la malaltia dels inhibidors de l'ACHÉ (Mori et al., 2006).

L'efecte neuroprotector dels IACHÉ durant els assajos clínics també ha estat demostrat utilitzant tècniques neuroradiològiques com MRI (Magnetic Resonance Imaging), MRS (proton Magnetic Resonance Spectroscopy) i PET (Positron Emission Tomography) (Modrego, 2006). Recentment s'ha proposat el seguiment de l'atròfia hipocampal com a marcador quantificable per comprovar l'eficàcia de fàrmacs en la modificació de la malaltia (Jack, Jr. et al., 1998; Mori et al., 2002). Precisament, entre les dades clíniques que suggereixen un possible efecte neuroprotector dels inhibidors d'ACHÉ, l'evidència més convincent es va obtenir en dos estudis de MRI en els quals es va comparar el volum hipocampal de pacients tractats amb donepezil durant un any amb el de pacients no tractats. En un d'aquests estudis la proporció mitjana d'atròfia hipocampal va resultar ser d'un 3,82 % en el grup tractat amb donepezil enfront del 5,04 % del grup control (Hashimoto et al., 2005), mentre que en un altre estudi es va observar que els pacients tractats amb donepezil presentaven descensos més petits del volum hipocampal total (-0,4 %) que els pacients del grup placebo (-8,2 %) (Krishnan et al., 2003).

4.3 Fàrmacs inhibidors tacrina-huperzina A. Antecedents

Desde 1990, la Unitat de Farmacologia de la Facultat de Medicina de la UAB ha estat col·laborant amb el Departament de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, dirigit pel Dr. Pelayo Camps, amb l'objectiu de dissenyar i sintetitzar nous derivats anticolinesteràsics amb un millor perfil farmacològic pel seu potencial ús terapèutic en el tractament de la MA.

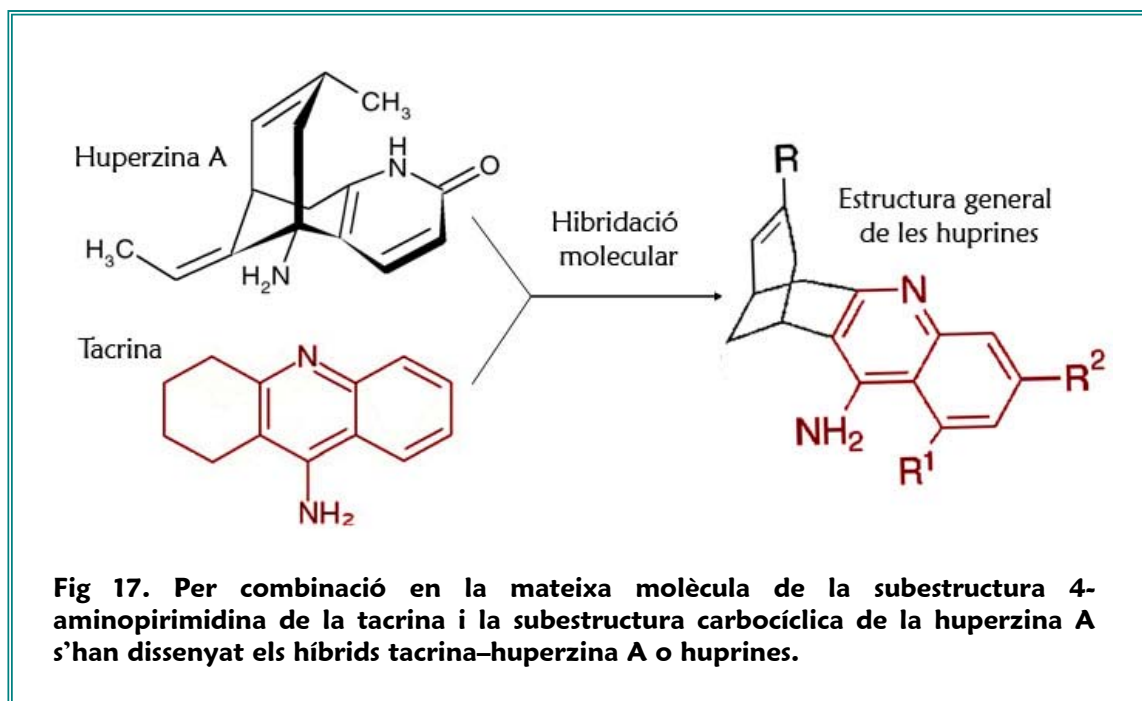
El desenvolupament de les huprines es va iniciar a començaments dels anys 90 quan els IACHe que avui s'utilitzen en el tractament de la MA encara estaven passant proves clíniques. En aquest moment, també s'acabava de resoldre l'estructura tridimensional de l'ACHe del Torpedo californica (TcACHe) (Sussman et al., 1991), malgrat que no s'havia cristal·litzat el complex de l'enzim amb cap inhibidor.

Per al disseny de les huprines, dos inhibidors coneguts van ser utilitzats com a model: la tacrina, que poc després va passar a ser el primer medicament per al tractament de l'Alzheimer comercialitzat i la huperzina A, un prometedor compost natural que havia estat aïllat d'una planta medicinal àmpliament utilitzada a la Xina i que avui en dia està en estudis de fase III als Estats Units.

La pràctica farmacèutica més utilitzada per desenvolupar nous medicaments és la modificació de medicaments ja coneguts (Wermuth, 2003). En canvi, la combinació en una sola molècula de dues molècules idèntiques o de dues unitats estructuralment diferents o fragments de medicaments coneguts amb l'objectiu d'incrementar la potència dels productes parentals o de complementar accions havia estat una estratègia inexplorada durant molt de temps (Muñoz-Torrero and Camps, 2008).

En una primera etapa es van analitzar alguns derivats del compost original, la tacrina, que mostraven un grau de toxicitat aguda menor (Aguado et al., 1994). En una segona fase, l'estratègia seguida va ser l'anàlisi de diversos fàrmacs obtinguts mitjançant la hibridació de la tacrina amb la huperzina A (fig. 17), fent múltiples substitucions en diverses parts de la molècula (Badia et al., 1998; Camps et al., 2000a; Ros et al., 2001). El resultat va ser l'obtenció de fàrmacs que inhibeixen l'ACHe amb elevada potència, alguns d'ells en el rang nanomolar, i amb toxicitat aguda relativa inferior la tacrina. Aquests fàrmacs híbrids tacrina–huperzina A, denominats huprines, són el resultat de la síntesi per farmacomodulació conjunta

de la huperzina A (subestructura carbocíclica) i la tacrina (subestructura 4-aminopirimidina), suprimint el grup etildilen de la huperzina.



El treball fet amb aquests nous compostos es basa en la hipòtesi colinèrgica de la MA que és la que ha generat l'actual abordatge terapèutic de dita malaltia. A partir d'estudis previs realitzats al nostre departament, s'ha posat de manifest la potentíssima activitat anticolinesteràsica de les huperines, superior a la tacrina, la huperzina A i a altres anticolinesteràsics utilitzats actualment en el tractament de la EA (Alcala et al., 2003a).

Mitjançant tècniques *in vitro* es va determinar la seva capacitat anticolinesteràsica, la reversibilitat de la unió amb l'enzim i es va determinar de quin tipus d'inhibició es tractava. Així mateix, es van dur a terme un experiment per determinar-ne l'activitat anticolinesteràsica *ex vivo*.

Els resultats obtinguts sobre el perfil colinèrgic han demostrat que, a més a més de ser potents inhibidors a l'AChE (Camps et al., 2000b), algunes d'elles presenten

activitat agonista sobre els receptors de tipus muscarínics M₁ (Roman et al., 2002a), potenciant així l'alliberament d'ACh, així com la d'altres neurotransmissors.

Una dada de gran interès sobre aquests compostos és la relacionada amb els receptors nicotínics. Se sap que la nicotina i altres agonistes d'aquests receptors tenen un paper rellevant en la neuroprotecció en diversos models de mort neuronal (O'Neill et al., 2002). Malgrat que no es coneixen bé els mecanismes intracel·lulars que intervenen en dit procés, es postula que estarien relacionats amb modificacions dels nivells de Ca²⁺ intracel·lular implicant vies de senyalització antiapoptotiques relacionades amb l'activació de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) i ERK/MAPK (Dajas-Bailador et al., 2003). En aquest sentit, s'ha demostrat que la huprina X (HX) presenta un efecte potenciador sobre el receptor nicotínic (Roman et al., 2004) similar al descrit per la galantamina.

També s'han dut a terme treballs amb les huprines (Camps et al., 2000b), en els quals se n'ha estudiat la capacitat d'unir-se al lloc perifèric de l'AChE en vistes a definir l'activitat antiagregant de la proteïna A d'aquests compostos (Camps et al., 2000a; Camps et al., 2005).

L'efecte proagregant de l'AChE sobre β A trobat per Inestrosa i el potencial com a tractament de la malaltia dels medicaments que interaccionen amb el lloc perifèric de l'AChE ha portat al desenvolupament de nous inhibidors de l'AChE en els darrers anys. El desenvolupament del concepte de compostos amb potencialitat per unir-se tant al lloc perifèric com al lloc catalític de l'AChE de Pang, Carlier i Han han obert les portes al disseny de nous compostos amb potencial activitat inhibidora del procés catalític i efecte antiagregant (Kwon et al., 2007; Munoz-Torrero and Camps, 2006). En aquest context i per optimitzar la família de les huprines, una unitat d'huprina Y es va combinar amb una unitat de 6-chlorotacrina, i va donar lloc a una molècula amb capacitat d'unir-se tant al lloc perifèric com al catalític de l'AChE (Carlier et al., 1999; Pang et al., 1996) (Belluti

et al., 2005; Hu et al., 2002; Munoz-Ruiz et al., 2005; Rodriguez-Franco et al., 2006). Totes dues unitats es van connectar amb un connector de longitud de la longitud i la naturalesa adequades per permetre que l'heterodímer resultant pugui arribar de manera simultània tant al lloc actiu com al lloc catalític de l'enzim. Els compostos Hup8TCl i Hup8TH pertanyen a aquest grup (fig. 18).

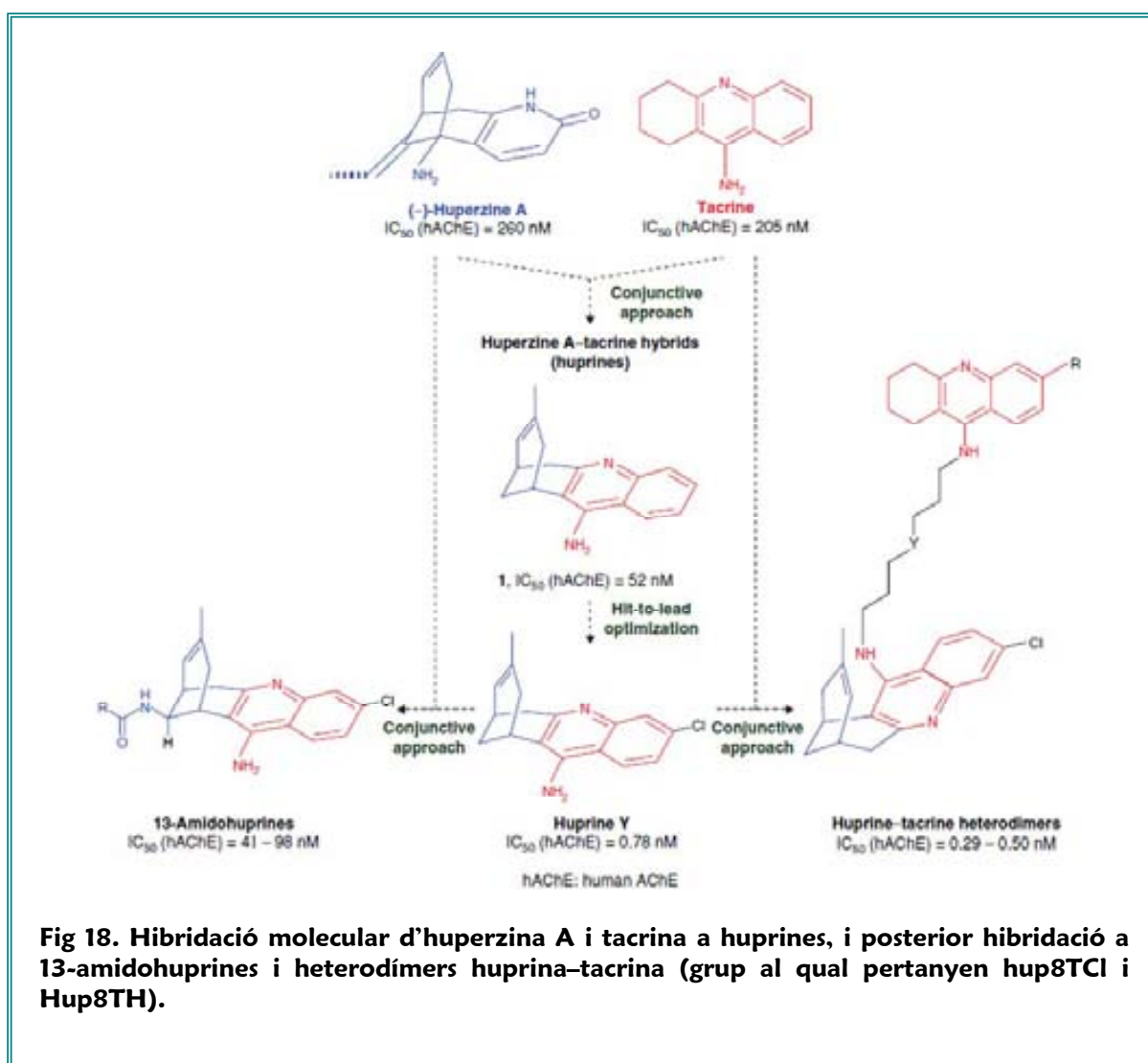


Fig 18. Hibridació molecular d'huperzina A i tacrina a huprines, i posterior hibridació a 13-amidohuprines i heterodímers huprina-tacrina (grup al qual pertanyen hup8TCl i Hup8TH).



EL PETÓ Gustav Klimt

OBJECTIUS

D'acord amb el que s'ha comentat anteriorment la presència de proteïnes amb caràcter amiloidogènic es comú a diverses malalties neurodegeneratives, essent aquest procés amiloidogènic molt similar en totes aquestes proteïnes. A més a més en la MA s'ha pogut veure que l'amioidogènesi de β A és accelerada per la presència d'AChE. En aquesta malaltia els anticolinesteràsics son actualment els medicaments més prescrits i tot que la seva eficàcia és molt variable, s'ha vist que la seva acció no està limitada a inhibir l'activitat catalítica de l'AChE, sinó que alguns d'ells a través de diversos mecanismes tenen efectes neuroprotectors. Aquests fets ens van portar a plantejar els següents objectius:

1. Determinar la possible capacitat de l'AChE per potenciar el procés d'agregació del pèptid priònic PrP106-126 d'una manera similar a la del pèptid β A. Comprovar la implicació del lloc aniònic perifèric de l'AChE.
2. Estudiar el procés d'agregació del pèptid priònic sintètic PrP82-146 en front a l'AChE donat que forma part dels pèptids implicats en les encefalopaties espongiformes bovines. Determinar la implicació del perifèric mitjançant el seu bloqueig amb iodur de propidi i estudiar en profunditat la cinètica d'agregació d'aquest pèptid priònic mitjançant la utilització de tècniques de microscòpia de força atòmica.
3. Estudiar l'efecte dels anticolinesteràsics Huprina X, Y i Z sobre l'agregació amiloidogènica induïda per l'AChE i especialment d'un grup d'heterodímers amb acció dual sobre el lloc catalític i perifèric, Hup8TCl i Hup8TH. A més també es proposa caracteritzar el perfil colinèrgic d'aquests anticolinesteràsics: determinant la potència d'inhibició dels enzims AChE bovina i humana, i BChE mitjançant la tècnica de Ellman's i avaluant l'afinitat pels receptors muscarínics M1 i M2 mitjançant la fixació de radiol·ligands.
4. Avaluar l'efecte neuroprotector enfront el peròxid d'hidrogen de les huprines X, Y i Z en cèl·lules PC12 diferenciades amb NGF i sense diferenciar. Analitzar la

possible causa d'aquest efecte protector mitjançant l'estudi de l'efecte dels fàrmacs sobre la SOD, els receptors muscarínics i nicotínics.



L'ARBRE DE LA VIDA Gustav Klimt

MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIAL I REACTIUS

1.1 Animals d'experimentació

Per als estudis de fixació de radiolligands es van fer servir rates Sprague-Dawley, amb un pes entre 350 ± 25 g. Tots els animals van ser subministrats per l'estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona. Durant el temps d'estabulació es van mantenir en condicions constants de temperatura (22 ± 2 °C) i humitat (40–60 %) amb un cicle de llum/obscuritat 12/12 hores i amb aigua i menjar *ad libitum*. El procediment pel qual els animals van ser sacrificats va ser aprovat per la comissió d'ètica de la UAB.

1.2 Reactius

Tots els productes químics emprats en el present treball, van ser de la puresa adequada per a l'anàlisi: acetonitril i glucosa de *Merk (Darmstadt, Alemanya)*; trizina base i àcid clorhídric de *Panreac Química S.A.*; acetiltiocolina (ASCh), àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic) (DTNB), butiriltiocolina (BSCh), clorur de sodi (NaCl), clorur de potassi (KCl₂), còctel inhibidor de proteases sense agents quelants, dimetil sulfòxid (DMSO), àcid tetraacètic d'etilendiamida (EDTA), estreptomina, factor de creixement nerviós- β (NGF- β), fosfat de potassi monobàsic (KH₂PO₄), fosfat de sodi dibàsic dihidratat (Na₂HPO₄·2H₂O), glutamina, HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S), medi RPMI 1640, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromur (MTT), penicil·lina, peròxid d'hidrogen (H₂O₂), piruvat sòdic, polietilenimina, poli-L-lisina hidrobromur, sèrum fetal boví, sèrum de cavall, tetraisopropil pirofosforamida (iso-OMPA), triton X-100 i vermell Congo de *Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)*; TRIS-hidroximetil-aminometà ultrapur de *MB Grade, USB (Cleveland, Ohio, EUA)*; eserina de *Fluka*; la [³H]-Pirenzepina amb activitat específica de 85,6 Ci/mmol de *NN Life Science Products, Inc. (Boston, USA)*; el I-quinuclidil[fenil-4-³H]benzilal ([³H]-QNB) amb activitat específica de 51.0

Ci/mmol i el líquid de centelleig d'Amersham (Buckinghamshire, UK); la pirenzepina de Boehringer (Barcelona).

Els enzims: acetilcolinesterasa (AChE) d'eritròcit boví i humana, BChE humana (BChE) i la tripsina-0,2g EDTA, es van adquirir a Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);

Els fàrmacs huprina X, huprina Y, huprina Z, Hup8TCl, Hup8TH i huperzina A van ser sintetitzats pel laboratori de química farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Iodur de propidi, galantamina i α -tocoferol es van obtenir de Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Les solucions patrons dels fàrmacs es van dissoldre en aigua bidestil·lada estèril, excepte el α -tocoferol, que es va dissoldre prèviament en etanol pur a una concentració de 20 mM sent la concentració final en el medi de 0,005 mM. La concentració d'etanol present al medi no va afectar la viabilitat cel·lular en les condicions experimentals aplicades. Els antagonistes: atropina i mecamilamina hidrocloreur van ser obtinguts de Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) i es van dissoldre en el solvent pertinent fins a la concentració desitjada.

Tots els pèptids priònics utilitzats en aquest treball: PrP106-126, PrP106-126-curmarina, PrP82-146, PrP82-146-curmarina, PrPscrambled, van ser sintetitzats pel "Laboratori di Chimica e Biochimica delle Proteine.Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. Milà. Itàlia" sota la direcció del Dr. Mario Salmona.

El material de cultiu va ser adquirit a TPP (Trasadingen, Suïssa). Per determinar l'activitat de la superòxid dismutasa es va utilitzar el SOD assay kit de Fluka, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) i per determinar la quantitat de proteïnes el bradford protein assay Bio-rad (Hercules, Califòrnia. EUA);

2. MÈTODES

2.1 Estudi de l'amiloidogènesi espontània i induïda per AChE dels pèptids priònics PrP₁₀₆₋₁₂₆ i PrP₈₂₋₁₄₆

2.1.1 PrP₁₀₆₋₁₂₆ i PrP₈₂₋₁₄₆

Per fer aquests experiments es van utilitzar dos pèptids sintètics homòlegs a les regions 106-126 (KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG), i 82-146 (GQPHGGGWG QGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGLGGYMLGSAMSRPIHF GSDYE) de la proteïna priònica humana (PrP) (De et al., 1994; Tagliavini et al., 2001). Es va disposar tant dels pèptids freds com dels pèptids marcats amb fluorescència amb una curmarina unida a un residu lisina (Lys). També es va disposar de les seqüències 106-126 scrambled i 82-146 scrambled.

2.1.2 Liofilització dels pèptids priònics

Abans de fer servir els pèptids per als estudis d'agregació, es van dur a terme liofilitzacions per millorar-ne les condicions de puresa. Els pèptids es van diluir, fins a arribar a una concentració entre 4 i 0,5 mM en funció de l'experiment, en una barreja d'aigua destil·lada i acetonitril al 50 % (v/v) amb un pH no superior a 8.

Una vegada diluïdes les mostres es van centrifugar a 12.000 rpm durant 11 minuts i posteriorment van ser congelades a -80 °C. Un cop congelades es va procedir a la liofilització dels pèptids priònics.

2.1.3 Agregació dels pèptids induïda per AChE. Estudi amb IChE

Amb els pèptids priònics es van dur a terme diferents estudis per determinar-ne la cinètica d'agregació al llarg del temps en presència i absència d'AChE i l'efecte sobre l'agregació d'aquests pèptids a l'exposició de diferents concentracions de l'enzim.

Els pèptids PrP106-126 i PrP82-146 un cop liofilitzats van ser dissolts en tampó TRIS-HCl 100 mM (pH 7,5) fins a aconseguir una concentració del pèptid d'1 mM. PrP106-126 va ser incubat a 0, 5, 24, 48 i 72 hores, mentre que PrP82-146 es va incubar durant 0, 24, 72, 96, 120 i 144 hores a temperatura ambient ja que té una cinètica d'agregació més lenta.

Per dur a terme els experiments de cinètica amb l'AChE, l'enzim es va dissoldre en el mateix tampó, TRIS-HCl 100 mM, després es va afegir a les mostres fins a una concentració final de 2,50 μ M i es va incubar durant els mateixos temps que el pèptid sense enzim.

Per confirmar si l'agregació induïda per l'AChE era dependent de la concentració d'aquest enzim, es van incubar els pèptids priònics en presència de diferents concentracions d'AChE que anaven des de 0,31 a 2,50 μ M.

Una vegada demostrat l'efecte de l'AChE sobre el procés d'agregació de PrP106-126 es va decidir iniciar un estudi que permetés determinar la capacitat inhibidora de determinats IChE sobre l'agregació del pèptid induïda per AChE. El procediment experimental que es va seguir va ser el mateix que en els estudis anteriors, però en aquest cas afegint el fàrmac a una concentració final de 0,1 μ M, conjuntament amb l'AChE 2,5 μ M (fig. 19).

El volum final de tots els assajos va ser de 30 μ l. Tots els experiments es van fer per triplicat. Una vegada transcorregut el temps d'incubació corresponent, per aturar el procés d'agregació en el moment desitjat les mostres es van centrifugar a 12.000 rpm durant 11 minuts, se'n va eliminar el sobrenedant i els precipitats es van congelar per a la seva posterior anàlisi.

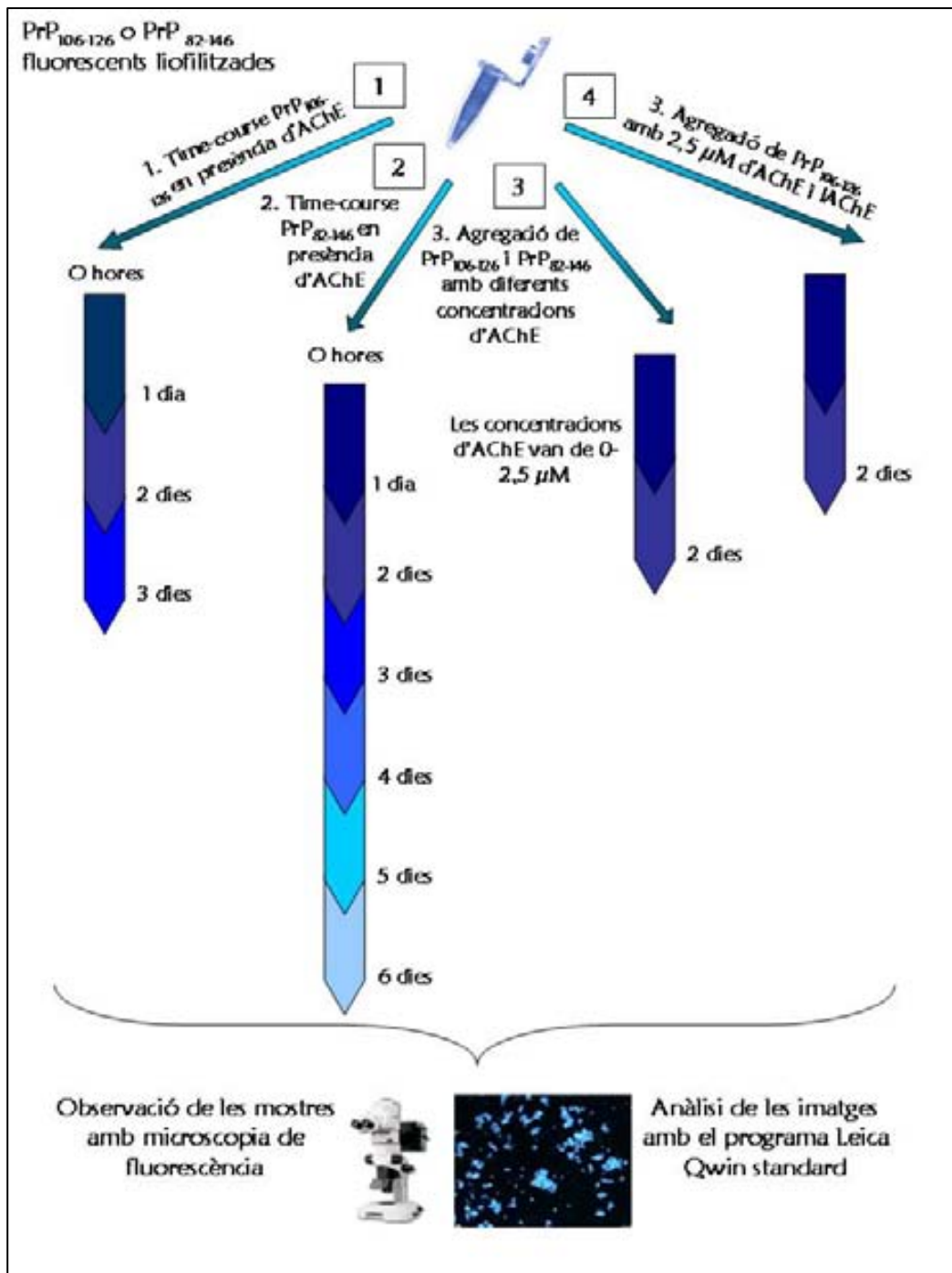


Fig 19. Esquema que mostra els diferents estudis que es van dur a terme amb els peptidus marcats amb fluorescència: determinació de la cinètica d'agregació, anàlisi d'influència de la presència de diferents concentracions d'AChE en el procés d'agregació i estudi de l'efecte dels IChE sobre el procés d'agregació dels peptidus induït per AChE.

2.1.4 Microscòpia de fluorescència i anàlisi d'imatges

Les mostres resultants de l'agregació dels pèptids marcats amb curmarina foren observades amb el microscopi de fluorescència. 10 μ l de la suspensió dels agregats de PrP106-126 o PrP82-146 fluorescents van ser disposats de forma homogènia sobre portaobjectes gelatinats i van ser observats amb microscopi de fluorescència (*OLYMPUS BX51, Japan*) a 20x augments. El fluorocrom que marcava els pèptids era la curmarina, que s'excita a una longitud d'ona de 340 nm i emet a 405 nm, tenint en compte aquestes característiques, el filtre del microscopi de fluorescència que es va utilitzar va ser el DAPI. De cada mostra es van prendre un mínim de 3 fotografies aleatòriament. Les imatges adquirides amb el microscopi de fluorescència es van analitzar posteriorment amb el programa *LEICA Qwin-standard image analysis program*.

2.1.5 Tinció amb vermell Congo i birefringència

Les mostres resultants del procés d'agregació del pèptid fred es van observar amb un microscopi de llum polaritzada després d'haver estat tenyides amb vermell congo. Per fer aquesta tinció, que permet detectar estructures amiloides, 10 μ l de la suspensió dels agregats dels pèptids priònics es van disposar de manera homogènia sobre portaobjectes gelatinats. Les mostres es van deixar assecar a l'aire i posteriorment van ser tenyides amb vermell Congo. Els agregats es van cobrir amb 100 μ l d'una solució al 2 % (p/v) de vermell Congo i 80 % d'etanol (v/v) en aigua bidestil·lada estèril. Transcorreguts 15 minuts es van netejar les mostres per immersió en etanol al 90 % durant dos minuts i per últim es van deixar assecar. La birefringència es va observar a 40x augments amb un microscopi òptic equipat amb un polaritzador (*Leitz DM RB. Oberkochen, Alemanya*).

2.1.6 Microscòpia electrònica

Els agregats dels pèptids freds també van ser observats amb microscòpia electrònica de transmissió per determinar-ne la ultraestructura. 10 μ l de les mostres es van dipositar sobre reixetes de coure tractades amb carbó. Transcorreguts dos minuts es va eliminar l'excés de líquid i es va procedir a fer la tinció negativa amb

acetat d'uranil al 2 % (p/v) durant dos minuts. Les mostres tenyides es van analitzar amb el microscopi electrònic de transmissió (*Hitachi H-7000, Hitachi LTD; Tokyo, Japó*).

2.1.7 Microscòpia de força atòmica

Totes les imatges de microscòpia de força atòmica (AFM) es van fer amb el microscopi *Agilent 5500 AFM/SPM*. L'anàlisi es va realitzar a temperatura ambient utilitzant un escàner multiusos de baixa coherència. Les sondes que es van fer servir eren del tipus FM de punta de silicó (de força constant ~ 2 N/m i freqüència ressonant ~ 75 KHz) des dels nanosensors. L'escaneig es va posar a punt proporcionalment a l'àrea escanejada i es va mantenir dins del rang de 0,5 – 1,2 Hz. La resolució de les imatges adquirides es de 512 píxels per línia. Les imatges van ser corregides, en els casos en què va caldre, amb el programari *MountainsMap*. Com a superfície per dipositar les mostres es va utilitzar un substrat de mica moscovita no tractada (*Scientec*) de diferents mides.

Les mostres tractades segons la descripció anterior, es van diluir entre 1 i 10 vegades amb aigua ultrapura i 10 μ l de la dilució es van afegir a temperatura ambient sobre mica acabada de tallar. Després d'assecar les mostres, les mesures es van fer sota condicions ambientals. L'AFM es va utilitzar en condicions de semicontacte, la qual cosa va permetre tant la resolució lateral com vertical en règim nanomètric.

Amb l'objectiu d'excloure possibles artefactes, mostres control com ara mica acabada de tallar i mica acabada de tallar mullada amb aigua ultrapura, van ser també analitzades.

Tots els patrons topogràfics descrits al text van ser confirmats amb mesures addicionals, de com a mínim tres àrees diferents ben separades (fig. 20).

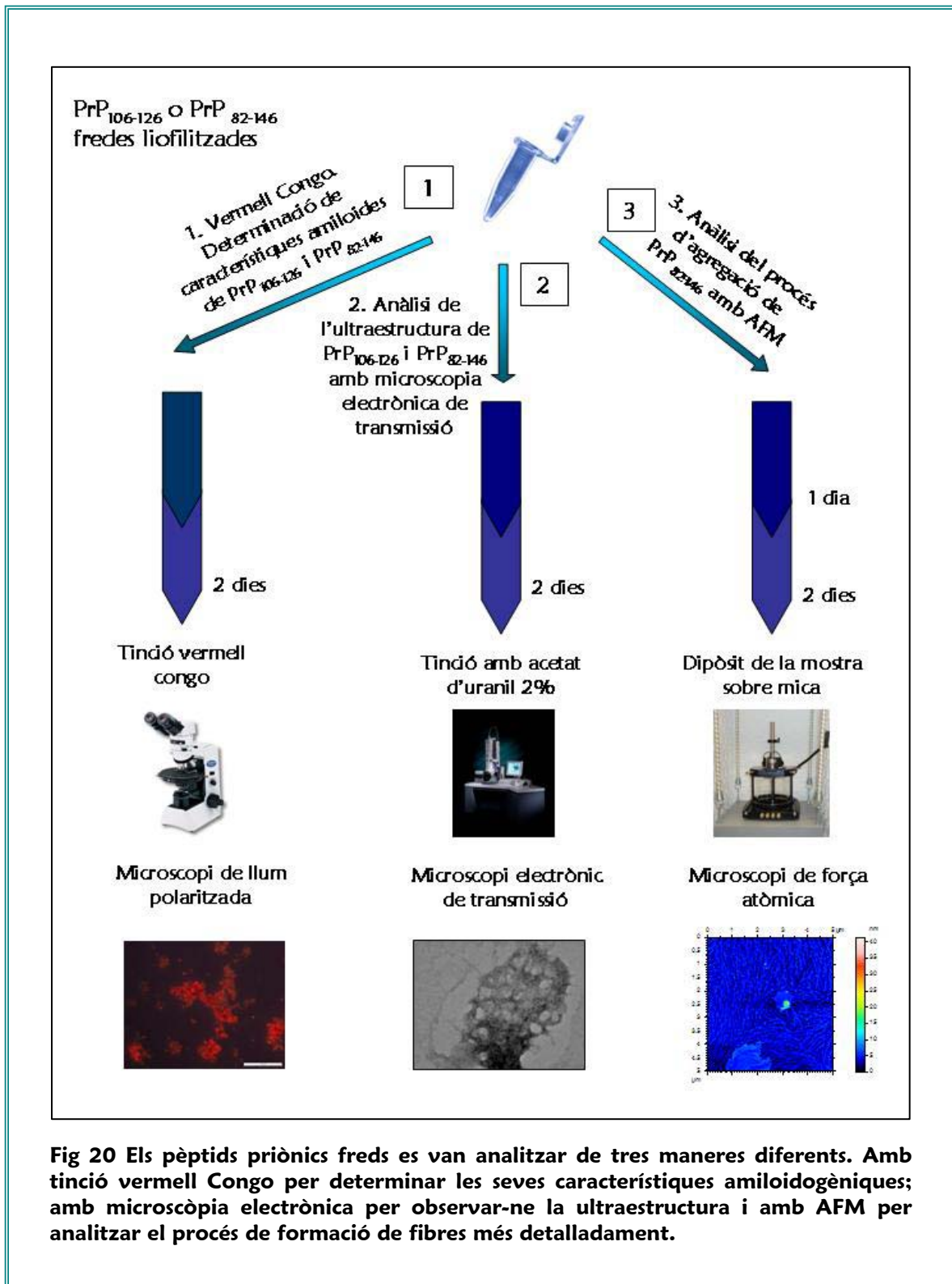


Fig 20 Els pèptids prionics freds es van analitzar de tres maneres diferents. Amb tinció vermell Congo per determinar les seves característiques amiloidogèniques; amb microscòpia electrònica per observar-ne la ultraestructura i amb AFM per analitzar el procés de formació de fibres més detalladament.

2.1.8 Càlculs

Amb l'objectiu d'analitzar les diferències entre els diversos tractaments experimentals, es van escollir els valors de mida màxima dels agregats de cadascuna de les fotografies de cada mostra, i amb aquests valors es van fer les mitjanes corresponents per cada mostra i posteriorment per cada tractament. A partir d'aquestes mitjanes es va calcular el percentatge d'agregació degut als diferents tractaments en relació amb els grups control (agregació espontània de PrP106-126 i PrP82-146). Els percentatges d'inhibició de l'agregació induïda per AChE es van calcular relacionant la mitjana de cada grup de fàrmacs amb la mitjana del grup control corresponent (agregació de PrP106-126 o PrP82-146 induïda per AChE).

2.2 Estudi de l'efecte antiagregant i anàlisi del perfil colinèrgic dels heterodímers huprina-tacrina Hup8TCl i Hup8TH

2.2.1 Efecte sobre el procés d'amiloidogènesi de PrP106-126

Els estudis de l'efecte dels híbrids huprina-tacrina sobre el procés d'amiloidogènesi es van dur a terme tal com s'ha detallat a l'apartat 2.1.

2.2.2 Determinació de l'activitat anticolinesteràsica in vitro

L'activitat anticolinesteràsica dels heterodímers huprina-tacina es va determinar espectofotomètricament seguint el mètode descrit per Ellman (Ellman *et al.*, 1961). Aquest mètode es basa en la reacció següent:



La primera part de la reacció consisteix en la degradació de l'ASCh per part de l'AChE, la qual produeix tiocolina i acetat. En la segona part s'esdevé la unió de la tiocolina al reactiu DTNB i es dona lloc a un producte de color groc. D'aquesta forma, la producció de color és indicadora de la quantitat d'ASCh degradada per l'AChE. La determinació de l'activitat inhibidora de l'enzim butirilcolinesterasa BChE es fa d'igual manera però en aquest cas és la butiriltiocolina (BSCh) la que serveix com a substrat.

Com a pas previ a l'estudi de l'activitat anticolinesteràsica, es va determinar la Km (concentració de substrat a la qual l'enzim funciona al 50 % de la seva velocitat màxima) per l'AChE i la BChE. Amb aquest objectiu es van afegir concentracions creixents d'ASCh o bé de BSCh a una quantitat determinada d'AChE (0,025 u/ml) bovina o humana o BChE humana (0,035 u/ml), respectivament. Un cop conegut el valor d'aquesta constant, es va treballar sempre al voltant d'aquesta concentració de substrat.

A continuació es va procedir a determinar la capacitat anticolinesteràsica dels diferents fàrmacs estudiats. Així l'activitat inhibidora de l'AChE es va avaluar utilitzant l'enzim d'eritròcits bovins i humans. Es van afegir concentracions creixents de l'inhibidor a una solució que contenia el tampó fosfat 0,1 M pH 8,0 DTNB 333 μ M i 0,025 unitats de l'enzim. Finalment, es va afegir ASCh (0,53 mM) com a substrat. La reacció va tenir lloc a la concentració final de 3 ml. Les corbes d'inhibició es van fer per triplicat incubant en solució descrita amb com a mínim 12 concentracions diferents de cadascú dels inhibidors durant 15 minuts a 25 °C. Un dels triplicats es va incubar en absència d'inhibidor per permetre que assolís el 100 % i pogués actuar així com a control. La reacció es va detenir afegint 100 μ l d' eserina 1 mM i la producció del color es va mesurar a una longitud d'ona de 412 nm mitjançant l'espectrofotòmetre Perkin-Elmer Lambda 2 equipat amb un canviador automàtic de sis cèl·lules. Es van dur a terme com a mínim sis experiments per cada fàrmac inhibidor. La determinació de l'activitat inhibidora de la BChE es va dur a terme de forma similar, utilitzant 0,035 unitats de l'enzim de sèrum humà i 0,56 del substrat BSCh, en un volum final d'1 ml.

Les dades obtingudes van permetre construir les corbes de concentració–inhibició per les huprines mitjançant l'anàlisi de regressió no lineal utilitzant el programa GraphPad (GraphPad software; San Diego, EUA), la qual cosa va donar una estimació de la concentració inhibidora 50 (CI50), és a dir, la concentració de fàrmac que inhibeix l'activitat de l'enzim al 50 %. Els resultats es van expressar com a mitjana de la CI50 \pm EEM (error estàndard de la mitjana). Les comparacions estadístiques es van fer mitjançant un test *t* de Student amb un nivell de significació de $p < 0,05$.

A més a més, es va determinar l'activitat creuada pels dos enzims objecte d'estudi (AChE i BChE) amb la finalitat de provar que la seva activitat podia ser específicament atribuïda a un d'ells. Per a això, un homogeneïtzat de l'enzim i DTNB en les concentracions abans descrites fou incubat durant cinc minuts a 37 °C

amb quatre concentracions diferents (0,1–100 μM) d'iso-OMPA (inhibidor selectiu de la BChE) o BW284c51 (inhibidor selectiu de l'AChE), seguint el protocol descrit per Cheng *et al.* (Cheng and tang, 1998). A continuació es va afegir el substrat i es va procedir a la lectura de l'absorbància. Cada experiment es va fer per triplicat i el control (mostra sense inhibidor) va representar el 100 % d'activitat.

2.2.3 Estudis de fixació de radiol·ligands als receptors muscarínics

a) *Obtenció de membranes*

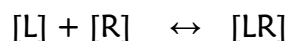
Es van sacrificar rates Sprague–Dawley de les característiques citades anteriorment, se'n van extreure els cervells i es van separar els hipocamps. Aquests es van diluir en tampó fosfat 10 mM pH 7,4 a raó de 100 mg teixit / 15 ml tampó. A continuació es van homogeneïtzar utilitzant un Polytron (PCU, Suïssa), realitzant tres cops de cinc segons separats 30 segons, mantenint sempre el teixit en un bany de gel.

b) *Estudis de saturació*

En aquests experiments es van incubar per triplicat alíquotes de la suspensió de membranes amb concentracions creixents de $[\text{H}^3]$ -pirenzepina o $[\text{H}^3]$ -QNB (en presència de pirenzepina 10 μM), en un rang comprès entre 0,2 i 8 nM. El volum final d'incubació va ser de 250 μl , dels quals 150 μl eren de preparació de teixit i la resta de tampó fosfat 10 mM pH 7,4. La incubació es va fer durant 60 minuts en un bany a 25 °C en agitació suau. A continuació es van afegir 4 ml de tampó fred (4 °C) i es van filtrar ràpidament sobre filtres de fibra de vidre Schleicher & Schuell amb ajuda d'un aparell de filtració al buit (Cell Harvester Brandel M24R). Amb la finalitat de reduir la unió inespecífica, els filtres s'havien mullat prèviament amb polietilenimina al 0,1 %, com a mínim 30 minuts abans de la seva utilització, es va disminuir la fixació del radiol·ligand al filtre. Després de tres rentats consecutius amb 4 ml de tampó de incubació a 4 °C, els filtres es van dipositar als vials de comptatge i es van assecar a 60 °C durant dues hores. Transcorregut aquest temps es van afegir als vials 4 ml de líquid de centelleig biodegradable (Amersham Life Science, Regne Unit) i es va determinar la radioactivitat retinguda a cada filtre per

espectrofotometria de centelleig líquid (comptador LKB Wallac 1209 Rackbeta, deficiència del 60 %). La fixació inespecífica, és a dir, la proporció de radiolligand unit a tot allò que no sigui receptor, es va determinar en presència d'una solució d'atropina 1 μM .

Com s'ha comentat, en un experiment de saturació s'incuben les membranes amb concentracions creixents de radiolligand. Assumint que el lligand s'uneix a un nombre finit de receptors, el fenomen pot descriure's de forma similar al desenvolupament de Michaelis-Menten per interacció enzim-substrat. En la seva forma més simple, la unió lligand-receptor pot descriure com una interacció bimolecular del tipus:



On $[L]$ és la concentració de lligand lliure, $[R]$ la de receptors lliures i $[LR]$ la de complexos lligand-receptor. L'equació que resumeix el procés és la següent:

$$B = \frac{B_{\max} [L]}{[L] + K_D}$$

A l'equació, B és la quantitat de radiolligand fixat en equilibri, B_{\max} és el nombre màxim de llocs de fixació i K_D és la constant de dissociació del complex radiolligand-receptor (concentració de lligand lliure necessària per obtenir un 50 % d'ocupació). K_D i B_{\max} es mesuren d'una forma senzilla mitjançant la transformació Scatchard (Scatchard, 1949). Partint de l'equació anterior, invertint termes i multiplicant-los per la B_{\max} s'obté, després d'ordenada, l'equació de Scatchard:

$$\frac{B}{L} = \frac{B_{\max}}{K_D} - \frac{1}{K_D} B$$

La representació de B/L enfront de B dona lloc a una recta quan el lligand s'uneix a un únic lloc de fixació, el pendent del qual és $-1/K_D$ i les interseccions dels quals

amb els eixos d'ordenades i abscisses són, respectivament, $B_{\text{màx}}/K_D$ i $B_{\text{màx}}$. Tanmateix, la linealització de Scatchard assumeix que la unió del radiolligand es fa sobre una població homogènia de receptors, així, per determinar possibles desviacions d'aquesta premissa, es van analitzar les dades experimentals amb la linealització de l'equació de Hill:

$$\log \left[\frac{[B]}{B_{\text{màx}} - [B]} \right] = n \log [B] - \log K_D$$

On n representa el pendent de la recta i es denomina coeficient de Hill (n_H). Valors de n_H propers a 1 indiquen l'existència d'una població homogènia de receptors, mentre que valors diferents posen de manifest la interacció del radiolligand amb més d'un receptor o bé amb una població heterogènia de receptors.

Els valors experimentals de fixació es van analitzar amb el programa LIGAND (Munson and Roadbard, 1980) que conté el paquet informàtic RADLIG (ELSEVIER-BIOSOFT). Es van fer cinc experiments independents per cada radiolligand, cadascun dels quals per triplicat i els valors obtinguts van representar la mitjana \pm EEM.

c) Estudis de competició

En aquests estudis es va valorar la capacitat dels heterodímers per desplaçar la fixació específica de $[H^3]$ -pirenzepina dels receptors muscarínics M_1 o bé la fixació de $[H^3]$ -QNB (ligand inespecífic dels receptors muscarínics) en presència de pirenzepina $10 \mu\text{M}$ (per bloquejar els receptors M_1) en el cas dels receptors M_2 . Es van incubar per triplicat les mostres amb concentracions creixents de cada fàrmac en presència d'una concentració fixa de radiolligand propera a la K_D ($[^3H]$ -pirenzepina 1 nM o bé $[^3H]$ -QNB 2 nM més pirenzepina $10 \mu\text{M}$). La radioactivitat inespecífica es va determinar incubant el teixit sense fàrmac i amb atropina $1 \mu\text{M}$.

La radioactivitat total es va mesurar substituint el fàrmac per tampó fosfat pH 7,4. La quantitat de teixit, el medi i les condicions d'incubació foren idèntiques a les utilitzades en els experiments de saturació.

Els resultats obtinguts en els estudis de competició es van analitzar per determinar la CI_{50} , és a dir, la concentració del fàrmac a la qual s'inhibeix el 50 % de fixació específica del radiolligand; aquesta dada es podria calcular de forma precisa mitjançant l'equació de Hill:

$$\log \frac{\%B}{100 - \%B} = n_H \log [I] + n \log CI_{50}$$

on %B és el percentatge de radiolligand desplaçat per una concentració [I] de competidor. La representació de $\log [\%B/100-\%B]$ enfront a $-\log [I]$ dona lloc a una recta el pendent de la qual és n_H , coeficient de Hill. El valor d'intersecció amb l'eix de les abscisses és igual al $-\log CI_{50}$. Un coeficient de Hill igual a 1 indica una relació 1 a 1 entre lligand i receptor si el valor de n_H és diferent de la unitat, això indica que hi ha una interacció més complexa entre lligand i receptor, o bé pot assenyalar l'existència d'una població heterogènia de llocs de fixació. La CI_{50} ve relacionada amb la K_i (constant de dissociació del competidor enfront al lloc de fixació del radiolligand) mitjançant l'equació de Cheng-Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973):

$$K_i = \frac{[CI_{50}]}{L + [L]/K_D}$$

Per a aquests estudis es van fer un mínim de quatre experiments per cada fàrmac i receptor, cada experiment es va fer per duplicat. Les CI_{50} K_i i els coeficients de Hill es van calcular com la mitjana \pm EEM. Les comparacions estadístiques es van fer mitjançant el test t de Student amb un nivell de significació fixat en $p < 0,05$. Els

resultats obtinguts es van analitzar mitjançant el programa de programari LIGAND paquet informàtic RADLIG (ELSEVIER-BIOSOFT), ajustant els punts experimentals mitjançant regressió no lineal a un model d'un sol lloc d'unió.

2.3 Estudis de neuroprotecció en cèl·lules PC12

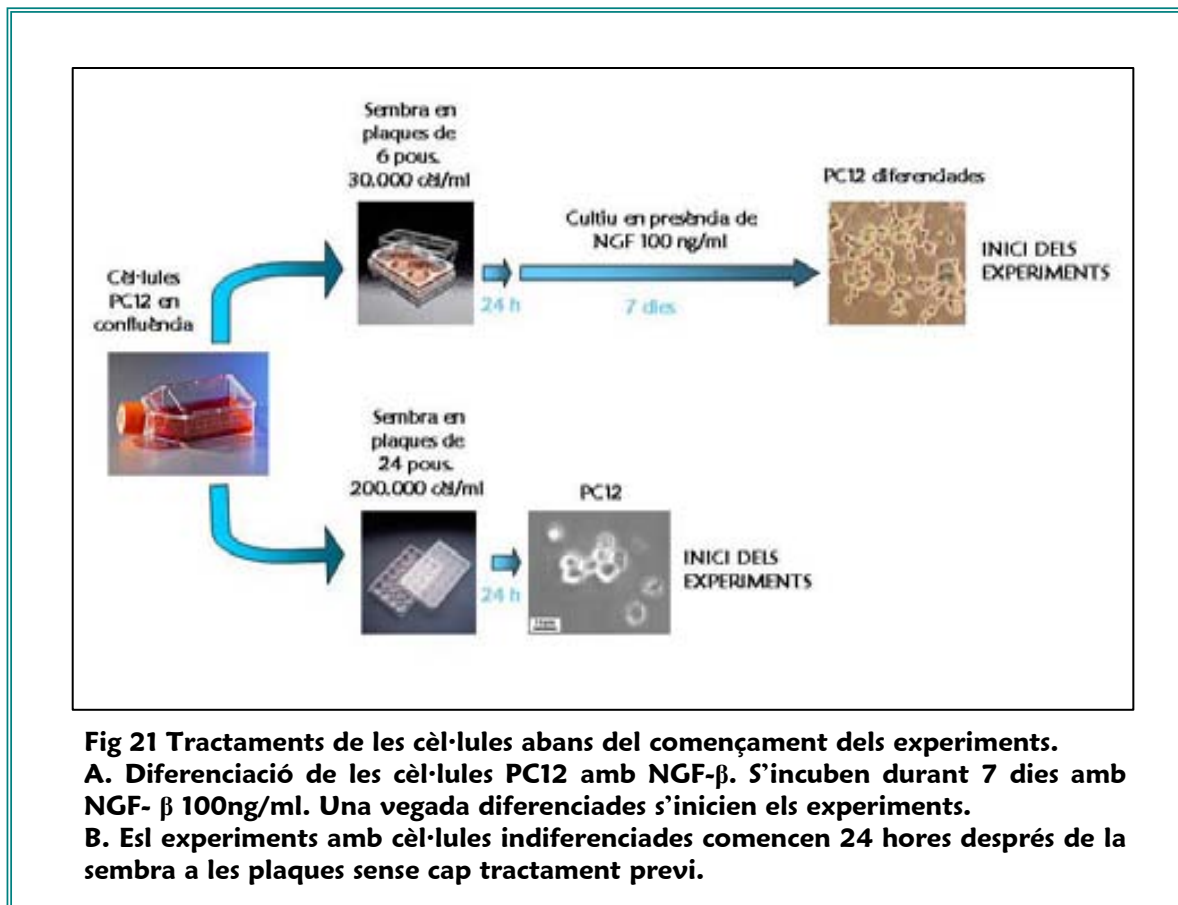
2.3.1 Cultiu cel·lular i tractament experimental

En els estudis de neuroprotecció realitzats es va utilitzar la línia cel·lular PC12; aquestes cèl·lules són tumorals, derivades de feocromocitoma de medul·la adrenal de rata. Gràcies al seu origen neural aquestes cèl·lules es poden diferenciar en neurones mitjançant la incorporació de factor de creixement neural (NGF) al medi de cultiu. En els treballs realitzats es van utilitzar cèl·lules PC12 indiferenciades i cèl·lules PC12 diferenciades.

Les cèl·lules PC12 es van cultivar a 37 °C en una atmosfera humidificada que contenia CO₂ al 5 %. Es va utilitzar medi RPMI 1640, complementat amb sèrum fetal boví inactivat al 5 % (v/v), sèrum de cavall inactivat al 10 % (v/v), glucosa 14 mM, HEPES 10 mM, glutamina 2mM, piruvat 1 mM, 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml d'estreptomicina. Una vegada van arribar a la confluència les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 o 24 pous, prèviament tractades amb poli-L-lisina al 50 % (p/v). La densitat cel·lular a les plaques de sis pous va ser de 30.000 cèl·lules/ml i a les de 24 pous, de 200.000 cèl·lules/ml.

Passades 24 hores del moment de la sembra es va procedir a la diferenciació amb NGF de les cèl·lules sembrades en plaques de sis pous, o al tractament amb diferents fàrmacs de les cèl·lules sembrades en plaques de 24 pous.

Per a la diferenciació cel·lular de la línia cel·lular PC12 es van incubar en presència de NGF a una concentració de 100ng/ml durant set dies, i posteriorment es va procedir al tractament amb els diferents fàrmacs (fig. 21).



Amb la finalitat d'induir l'estrès oxidatiu es va utilitzar peròxid d'hidrogen (H_2O_2) en un ampli rang de concentracions que es van preparar a partir d'una solució mare (30 % p/v) just abans de cada experiment. Amb l'objectiu de seleccionar la concentració de H_2O_2 necessària per induir una mortalitat del 50 % es va fer una corba concentració-resposta (fig. 22) a partir de la qual es va obtenir una concentració eficaç 50 (CE50) de 208,5 μM . En conseqüència, es va utilitzar la concentració de 200 μM per als assajos de viabilitat cel·lular.

Després del pretractament de 24 o 48 hores amb els fàrmacs objecte d'estudi, es va afegir el peròxid d'hidrogen 200 μM a les cèl·lules durant dues hores. Transcorregut el temps d'exposició al H_2O_2 les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van fer els assajos de viabilitat cel·lular o de determinació d'activitat de la superòxid dismutasa (SOD). La vitamina E 5 μM es va utilitzar com a control positiu de

l'increment de la viabilitat cel·lular en presència de H_2O_2 i va donar els resultats esperats ($78 \% \pm 2 \%$ de percentatge de protecció $p < 0,001$).

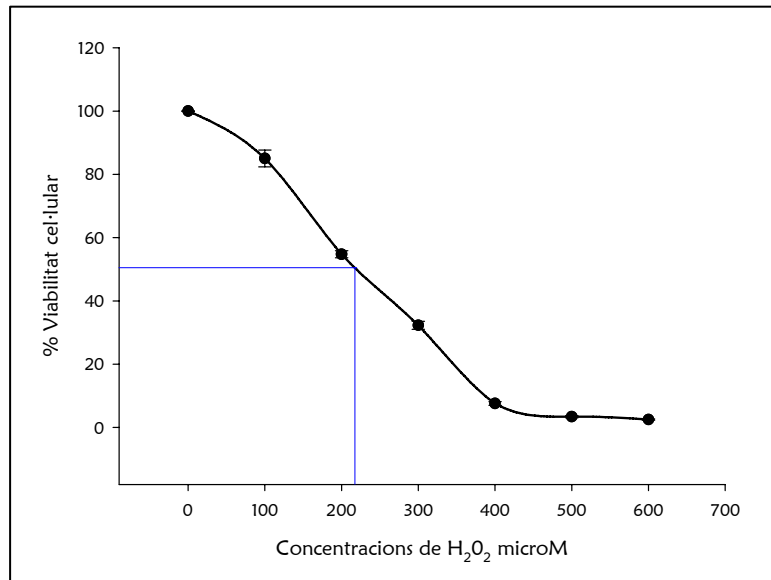
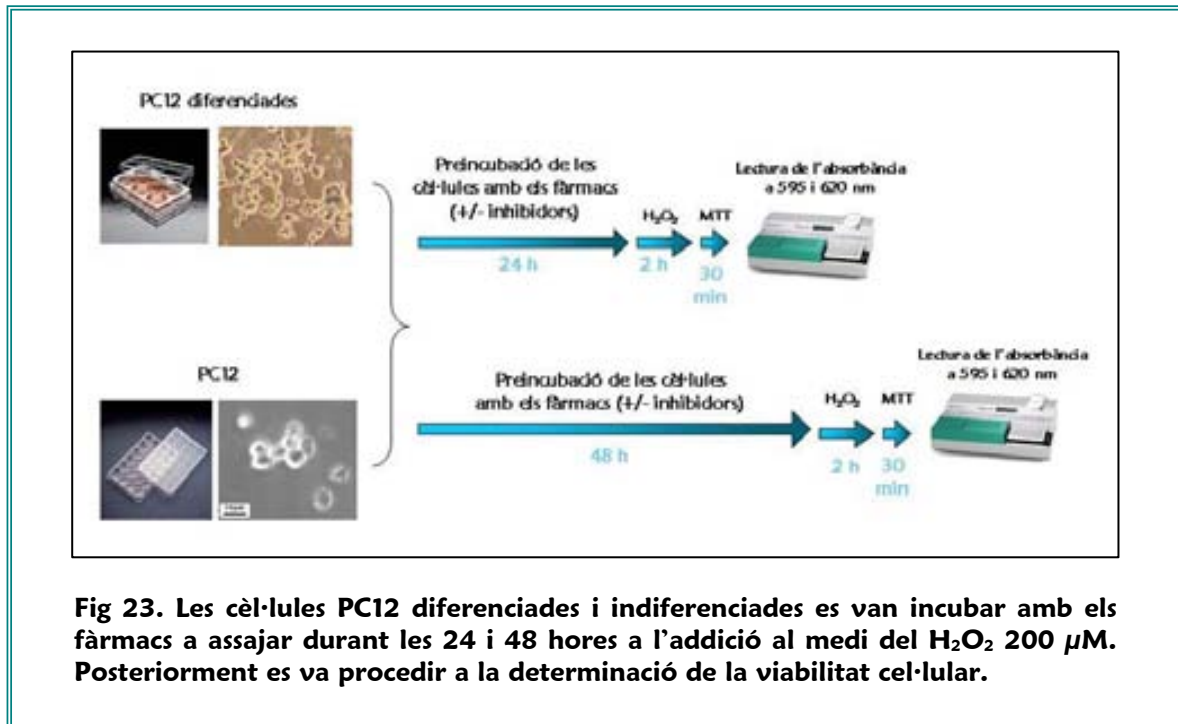


Fig 22. Corba que mostra la relació entre la concentració de H_2O_2 (μM) i el percentatge de viabilitat de les cèl·lules PC12. Les dades representen la mitjana dels percentatges de viabilitat \pm l'error estàndard de com a mínim tres

2.3.2 Assaig de determinació de la viabilitat cel·lular

La viabilitat cel·lular es va avaluar mitjançant la reducció del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromidi (MTT). Els mitocondris actius de les cèl·lules vives poden reduir el MTT per produir formazan, la quantitat del qual està directament relacionada amb el nombre de cèl·lules vives. Per determinar la viabilitat de les cèl·lules després dels diferents tractaments es va retirar el medi i posteriorment es va afegir al cultiu el MTT dissolt en medi de cultiu a una concentració de 0,5 mg/ml durant 30 minuts. Posteriorment es van eliminar les restes de medi i es va dissoldre el formazan resultant en DMSO. La quantitat final de formazan va ser quantificada per determinar l'absorbància a les longituds d'ona de (λ) 585 nm i 620 nm utilitzant l'espectrofotòmetre Multiskan (*Labsystems multiskan MS, type*

352). L'absorbància final és el resultat de la diferència d'absorbàncies: absorbància a 595 menys absorbància a 620 (fig. 23).



2.3.3 Assaig per a la determinació de l'activitat de la superòxid dismutasa

La superòxid dismutasa (SOD) catalitza la dismutació de l'anió superòxid (O_2^-) a peròxid d'hidrogen i oxigen molecular. La seva activitat fa que sigui un dels enzims oxidatius més importants. Amb l'objectiu de determinar l'activitat de la SOD en les nostres cèl·lules vam utilitzar el SOD assay Kit-WST. Aquest test permet mesurar l'activitat de la SOD en el llisat provinent de les nostres cèl·lules tractades. El test incorpora una sal tetrazòlica altament soluble en aigua (sal de Dojindo) que quan és reduïda amb un anió superòxid produeix formazan soluble en aigua; el grau de reducció amb O_2^- està linealment relacionat amb l'activitat de la xantina oxidasa (XO), que és inhibida per la SOD (fig. 24). Aquest test va permetre calcular l'activitat de la SOD mitjançant una reacció colorimètrica.

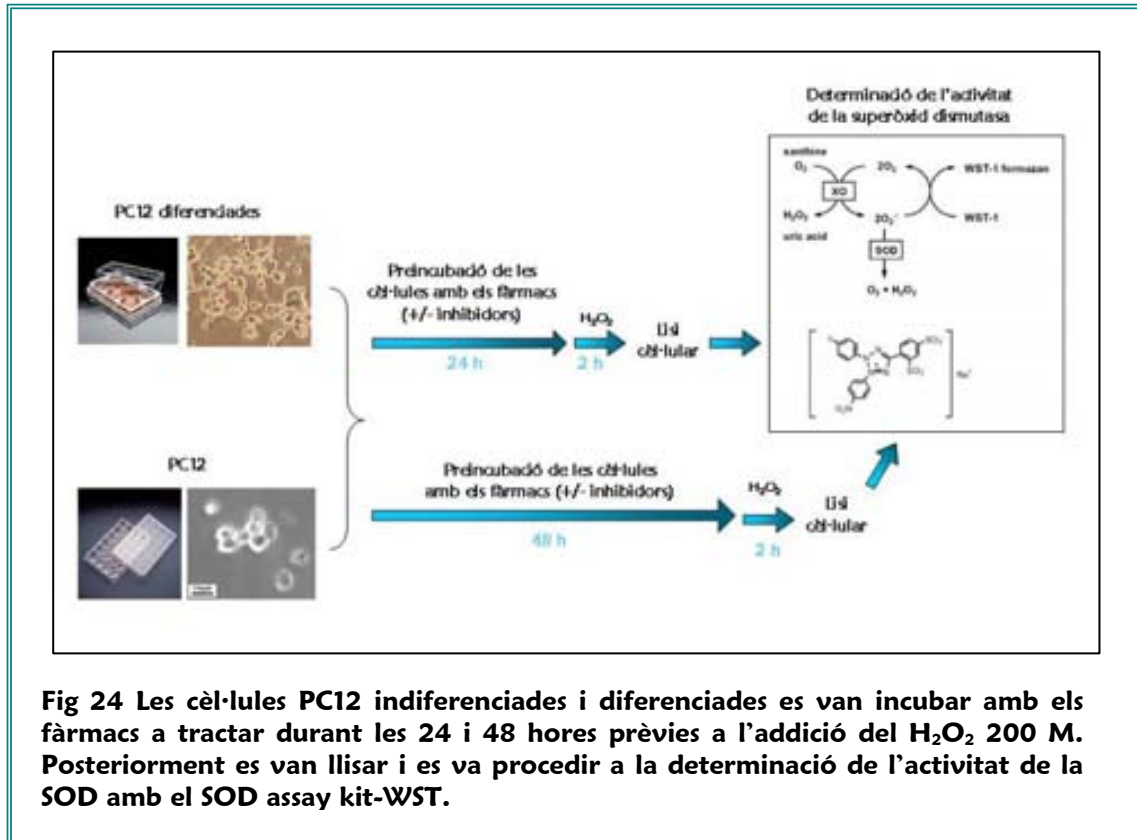


Fig 24 Les cèl·lules PC12 indiferenciades i diferenciades es van incubar amb els fàrmacs a tractar durant les 24 i 48 hores prèvies a l'addició del H₂O₂ 200 M. Posteriorment es van llisar i es va procedir a la determinació de l'activitat de la SOD amb el SOD assay kit-WST.

2.3.4 Càlculs

Les modificacions de viabilitat cel·lular observades en els diferents grups de tractament es van calcular com a percentatge en relació amb la mitjana del grup control (percentatge de supervivència). El percentatge de neuroprotecció va ser calculat emprant l'equació següent (Ved et al., 1997):

$$\% \text{ Protecció} = \frac{\text{Supervivència (Fàrmac i H}_2\text{O}_2) - \text{Supervivència (H}_2\text{O}_2)}{\text{Supervivència (Control positiu) - Supervivència (H}_2\text{O}_2)} \times 100$$

L'activitat de la SOD (% inhibició) es calcula amb l'equació següent, proporcionada pel SOD assay kit-WST:

$$\% \text{ Inhibició} = \frac{(\text{Abs blanc1} - \text{Abs blanc3}) - (\text{Abs mostra} - \text{Abs blanc2})}{(\text{Abs blanc1} - \text{Abs blanc3})} \times 100$$

	Mostra	Blanc 1	Blanc 2	Blanc 3
Mostra	X		X	
H₂O bisdestil·lada		X		X
WST solució de treball	X	X	X	X
Solució de treball de l'enzim	X	X		
Tampó diluent			X	X

L'activitat de la SOD es relativitza amb la quantitat de proteïna, de manera que el resultat final s'expressa en activitat de l'enzim per μg de proteïna total.

3. ANÀLISI ESTADÍSTICA

En tots els casos, els resultats s'han expressat com la mitjana \pm l'error estàndard, com a mínim, de tres experiments realitzats per triplicat.

Per analitzar les diferències entre els grups de tractament es va utilitzar el test de la t de Student de dues cues per grups desaparellats. Per comprovar les mitjanes de més de dos grups es va fer servir el test d'anàlisi de la variància (ANOVA) d'un factor seguit del test de Dunnett o del Tukey test. El nivell de significació es va fixar en $p < 0,05$.



L'ESPERANÇA II Gustav Klimt

RESULTATS

1. ESTUDIS D'AGREGACIÓ

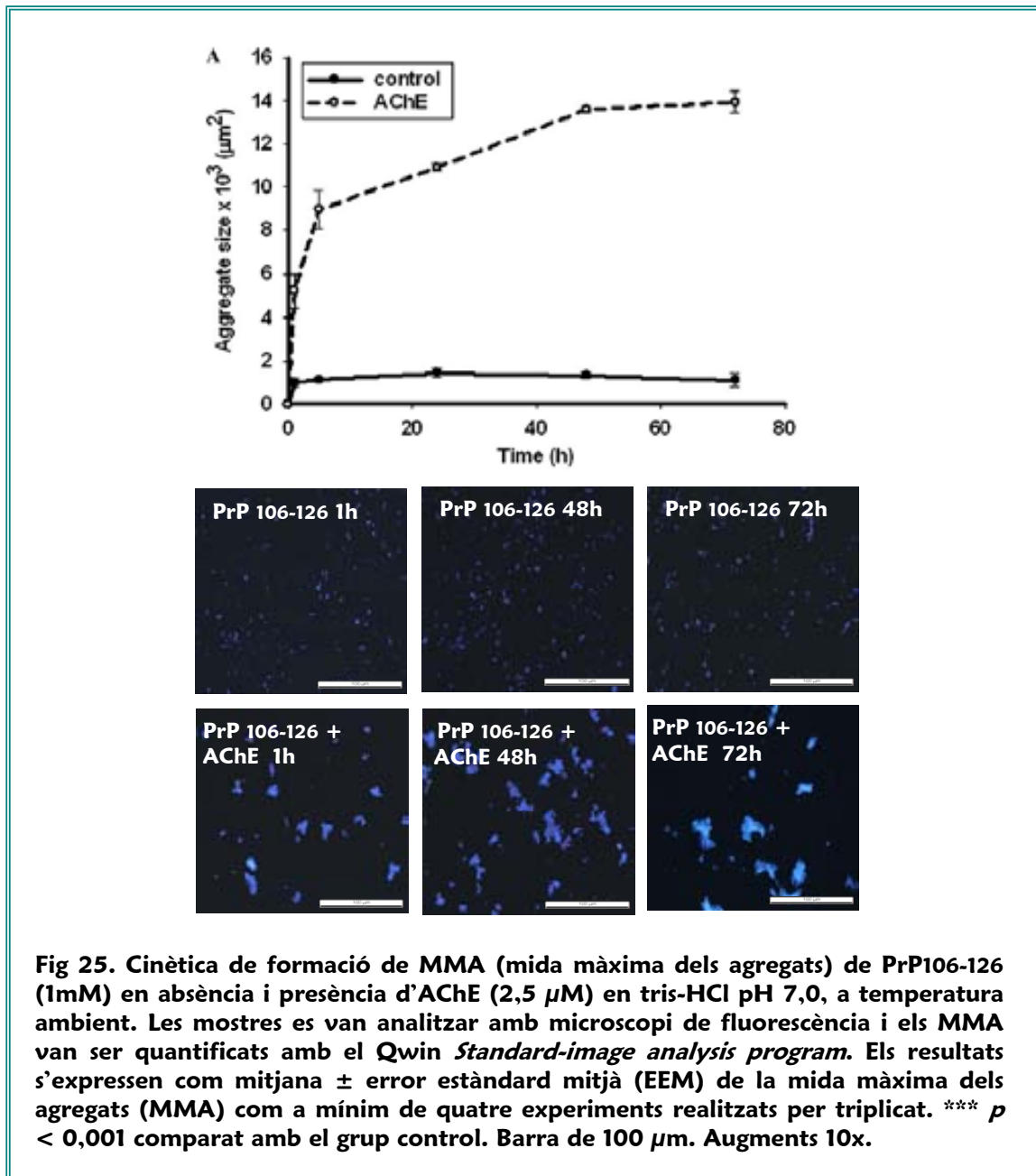
1.1 Agregació del pèptid PrP₁₀₆₋₁₂₆

Hi ha gran varietat de malalties que poden presentar causes i mecanismes comuns, entre altres, la fibril·lació, l'agregació i l'acumulació de proteïnes en el cervell que condueixen a la mort neuronal. En la malaltia d'Alzheimer és el pèptid β A el que segueix aquest procés, mentre que en les malalties priòniques ho és PrP. Malgrat això el procés és molt similar, amb la principal diferència de que les demències priòniques tenen un curs més ràpid que la demència tipus Alzheimer.

La similitud dels processos que condueixen a ambdues malalties ens va portar a estudiar el procés d'agregació de PrP i si l'AChE, que té un clar paper potenciador en l'agregació de β A, també ho té en el procés d'agregació de PrP. Per tal de dur a terme aquests estudis es van utilitzar els pèptids priònics PrP₁₀₆₋₁₂₆ i PrP₈₂₋₁₄₆. El primer d'ells, PrP₁₀₆₋₁₂₆, conté una seqüència on es produeix el plegament β , i el segon, PrP₈₂₋₁₄₆, també conté aquesta regió però és més llarg i té un procés d'agregació més lent que ens permet observar en més detall algunes de les característiques del procés.

1.1.1 Cinètica d'agregació de PrP₁₀₆₋₁₂₆

La cinètica de formació de fibres de PrP₁₀₆₋₁₂₆ en presència i absència d'AChE va ser analitzada durant un període de 72 hores. Respecte la cinètica d'agregació portada a terme en presència d'AChE (2,5 μ M) mostrava un increment significatiu i progressiu de la MMA, que arribà als seus valors màxims després de 48 i 72 hores d'incubació (13.600 ± 136 i $13.943 \pm 502 \mu\text{m}^2$, respectivament; $p < 0,001$; fig. 25). Després d'una hora d'incubació, els valors MMA de les mostres incubades en presència d'AChE ($5.224 \pm 563 \mu\text{m}^2$), eren molt més elevats que els de les mostres control incubades en absència de l'enzim.



1.1.2 Efecte de la concentració d'AChE en el procés d'agregació PrP106-126

Com que l'efecte màxim de l'agregació de PrP106-126 induït per l'AChE es va observar entre les 48 i les 72 hores d'incubació, es va estudiar l'efecte de diferents concentracions de l'enzim sobre dita agregació transcorregudes 48 hores des de l'inici de la incubació. Amb aquest objectiu es va incubar el pèptid en presència d'AChE a les concentracions de 0,31, 0,62, 1,25 i 2,50 μM.

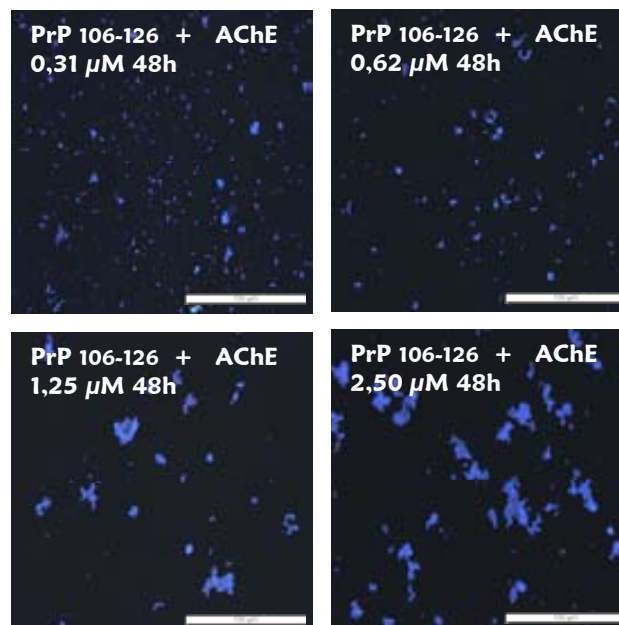
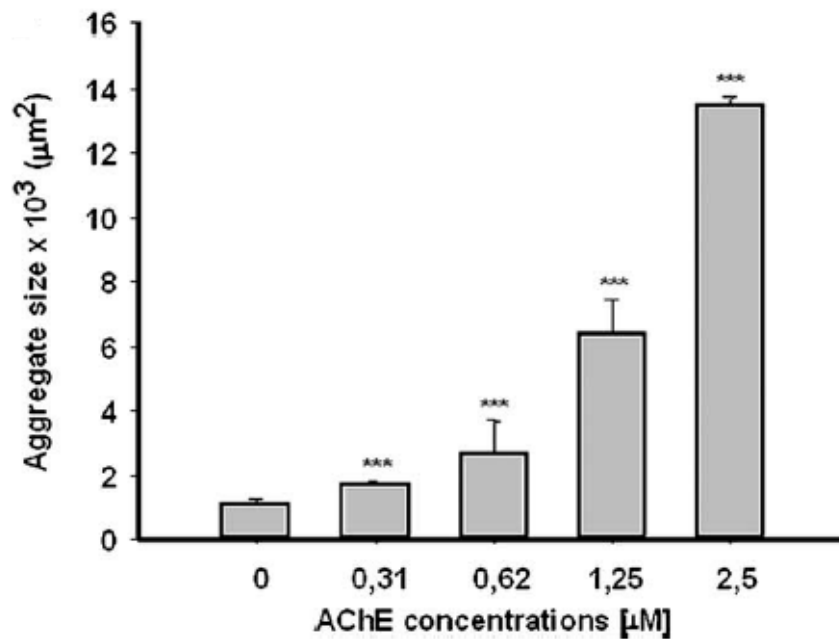


Fig 26. Valors de MMA de PrP106-126 1mM incubats durant 48 h en concentracions creixents d'AChE. Les mostres es van analitzar amb microscopi de fluorescència i la MMA va ser quantificada amb el *Qwin Standard-image analysis program*. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de la mida màxima dels agregats (MMA) com a mínim de quatre experiments realitzats per triplicat. *** $p < 0,001$ comparat amb el grup control. Barra de 100 μm .

Tal com es pot observar a la figura 26 ja a la concentració de $0,31 \mu\text{M}$ s'aprecia un increment significatiu de la mida màxima dels agregats ($p < 0,001$), incrementant aquesta de manera dependent a la concentració.

1.1.3 Estudis d'inhibició de l'agregació de PrP106-126 induïda per AChE

Com que s'ha descrit que l'efecte pro-agregant de l'AChE sobre el pèptid βA està relacionat amb el lloc perifèric i s'ha demostrat que els inhibidors específics d'aquest inhibeixen l'efecte; s'ha estudiat l'acció antiagregant de diferents tipus d'IChE: competitiu, no competitiu i mixts (taula 2).

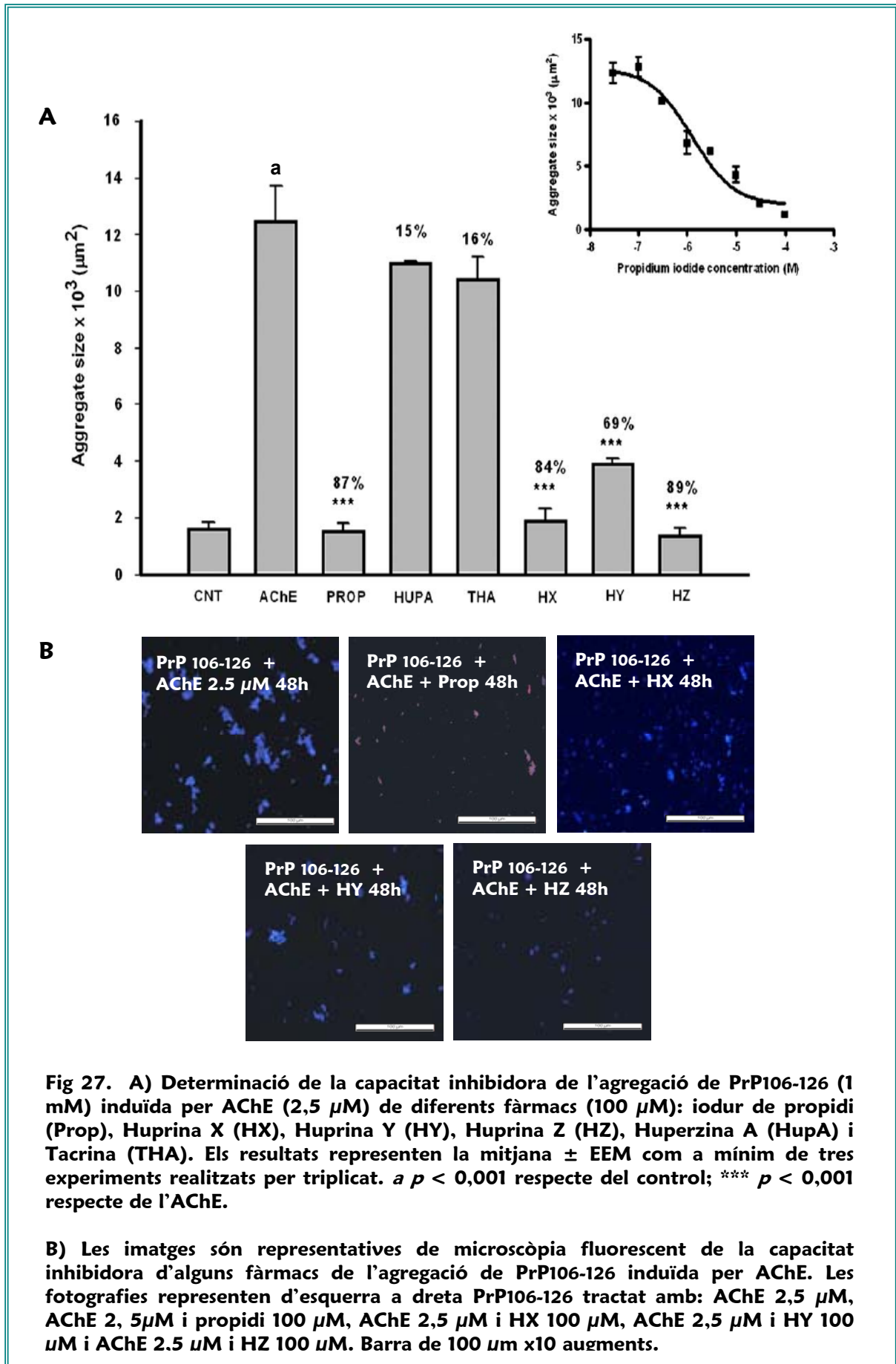
Taula 2. Inhibició de l'agregació de PrP106-126 induïda per l'AChE $2,5 \mu\text{M}$. Tipus d'activitat acetilcolinesteràsica i IC_{50} enfront a l'AChE bovina o humana.

COMPOSTOS $100 \mu\text{M}$	% INHIBICIÓ DE L'AGREGACIÓ	TIPUS DE D'INHIBICIÓ	AChE IC_{50} nM	Referència
Propidi	$87 \% \pm 5\%$	No competitiva	$3,23 \pm 0,22 \times 10^4$	(Bartolini et al., 2003a) ^h
Huprina X	$84 \% \pm 3\%$	mixta	$4,23 \pm 0,86$	(Roman et al., 2002b) ^b
Huprina Y	$69 \% \pm 5\%$	mixta	$6,98 \pm 0,42$	(Alcala et al., 2003b) ^b
Huprina Z	$89 \% \pm 6\%$	mixta	$5,09 \pm 1,05$	(Alcala et al., 2003c) ^b
Huperzina A	$15 \% \pm 2\%$	competitiva	$74,05 \pm 5,50$	(Alcala et al., 2003d) ^b
Tacrina	$16 \% \pm 1\%$	mixta	130 ± 10	(Alcala et al., 2003e) ^b

h = AChE humana

b = AChE bovina

S'ha descrit que el iodur de propidi inhibeix el lloc perifèric de l'AChE (Taylor and Lappi, 1975; Taylor and Radic, 1994) i ha estat àmpliament demostrat que pot inhibir l'agregació de βA induïda per AChE (Bartolini et al., 2003b; Inestrosa et al., 1996). D'acord amb aquestes dades, quan PrP106-126 i l'AChE van ser incubats simultàniament amb iodur de propidi $100 \mu\text{M}$ es va obtenir una IC_{50} d' $1,27 \pm 0,1 \mu\text{M}$ i una reducció del 87 % de la MMA (fig. 27).



Tant el iodur de propidi com les huprines X, I i Z van revertir l'efecte agregant de l'AChE mentre que la huperzina A i la tacrina no va modificar de forma significativa l'agregació de PrP106-126 induïda per l'AChE (fig. 27).

L'efecte d'aquests compostos sobre l'agregació induïda per l'AChE es va determinar 48 hores després de la incubació i l'agregació va ser analitzada mitjançant microscòpia de fluorescència.

1.1.4 Estudis de l'estructura amiloide dels agregats de PrP106-126: tinció vermell Congo i anàlisi per microscòpia electrònica

La natura dels agregats generats per PrP106-126 en absència i presència de l'AChE va ser examinada amb llum polaritzada (prèvia tinció amb vermell Congo) i amb microscòpia electrònica.

Com es pot observar a la figura 28, els agregats macromoleculars de PrP106-126 i PrP106-126-AChE mostren propietats de tinció i òptiques típiques d'estructures amiloides quan són observades amb un microscopi de llum polaritzada després d'una tinció amb vermell Congo (colorant que només tenyeix estructures amiloides). Les propietats birefringents dels agregats són més remarcables quan les mostres han estat incubades amb AChE atès el notable increment de la mida dels agregats.

L'estructura amiloide dels agregats també va ser confirmada per l'anàlisi amb microscòpia electrònica. En absència i presència d'AChE, els agregats de PrP106-126 tenyits amb acetat d'uranil mostren que estan formats per fibres no ramificades entre 4–8 nm de diàmetre (fig. 28). Com pot observar-se la quantitat de fibres amiloides és superior en les mostres incubades amb AChE.

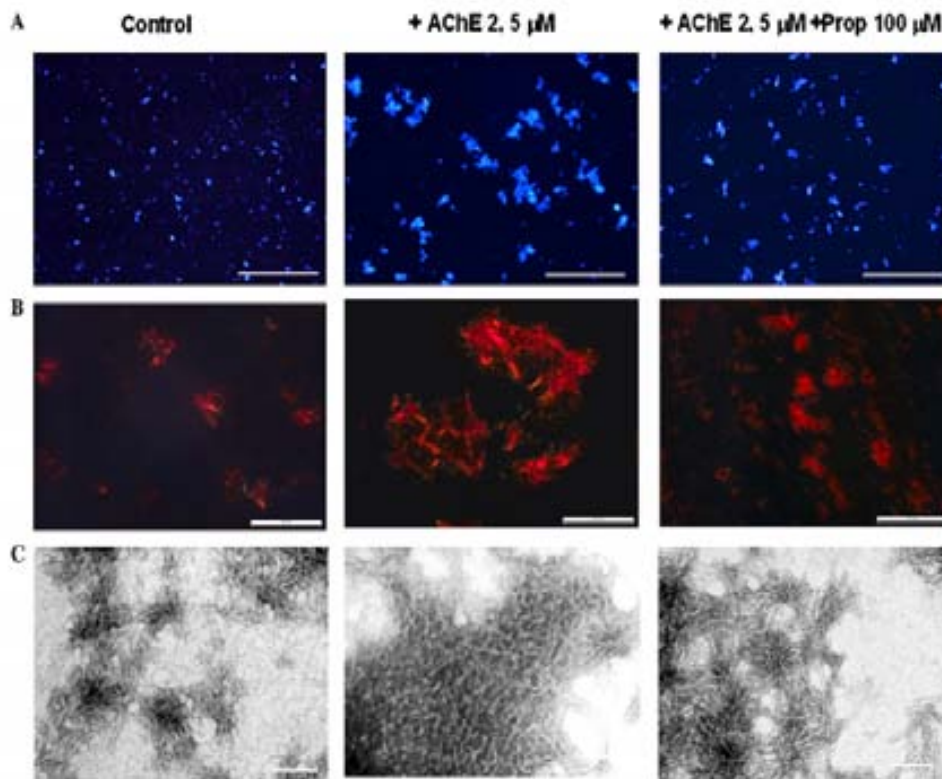


Fig 28. A) Microfotografies fluorescentes d'agregats generats *in vitro* durant 48 hores d'incubació amb PrP106-126 (1mM) curmarinada: (1) controls, (2) AChE 2,5 μM i (3) AChE 2,5 μM amb iodur de propidi 100 μM. Barra de 100 μm. Augments 10x.

B) Tinció vermell Congo d'agregats generats *in vitro* durant 48 hores d'incubació amb PrP106-126 (1mM) curmarinada: (1) controls, (2) AChE 2,5 μM i (3) AChE 2,5 μM amb iodur de propidi 100 μM. Barra de 50 μm. Augments 40x.

C) Fotografies realitzades amb microscopi electrònic de transmissió TEM d'agregats generats *in vitro* durant 48 hores d'incubació amb PrP106-126 (1mM) curmarinada: (1) controls, (2) AChE 2,5 μM i (3) AChE 2,5 μM amb iodur de propidi 100 μM. Barra de 100 nm. Augments 70.000x.

1.2 Agregació del pèptid PrP₈₂₋₁₄₆

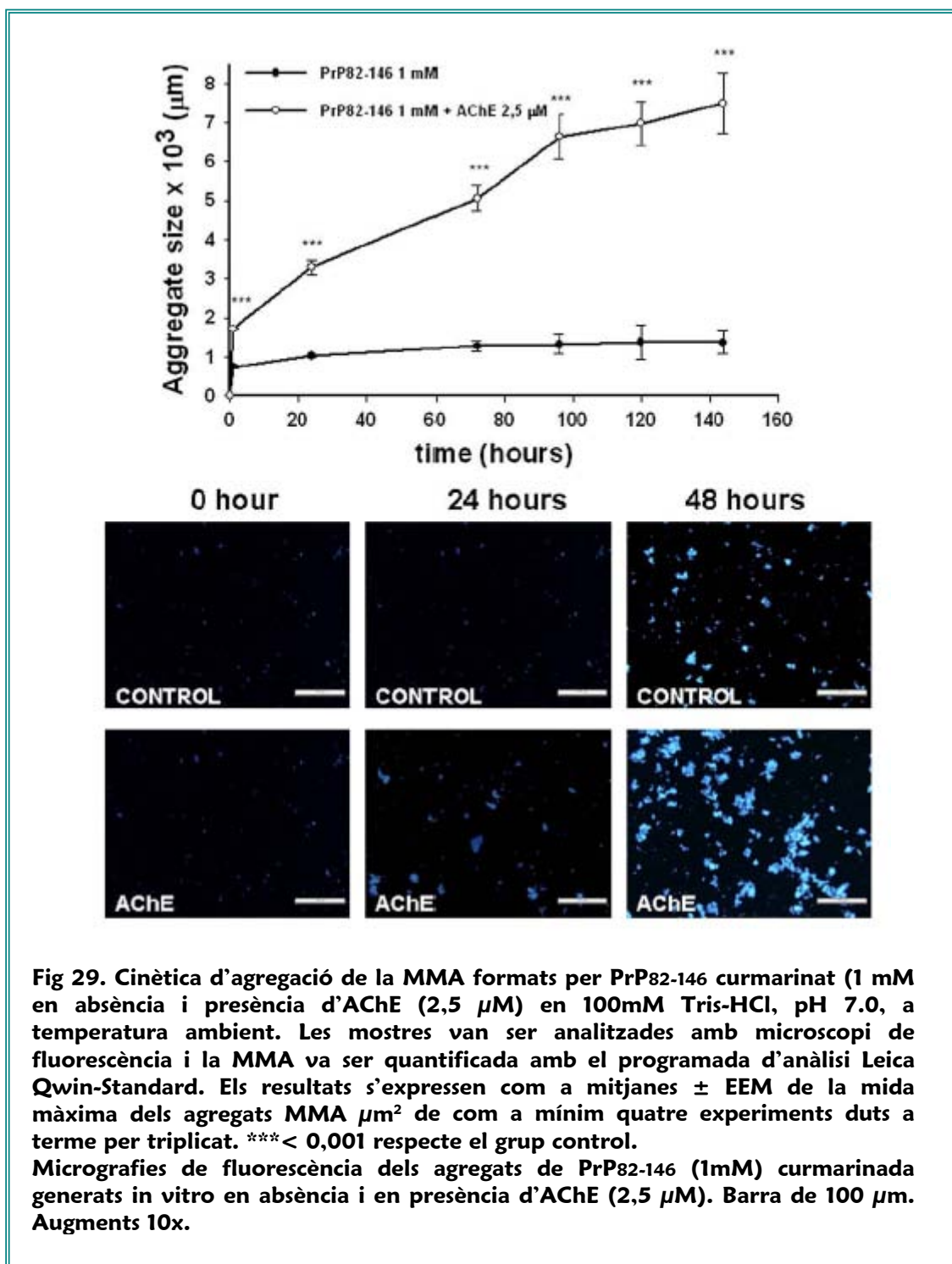
Degut als resultats obtinguts amb el peptid PrP₁₀₆₋₁₂₆ en presència d'AChE, vam considerar de gran interès analitzar si aquest efecte proagregant de l'enzim també es posava de manifest amb el pèptid priònic PrP₈₂₋₁₄₆. Aquest pèptid conté la regió del plegament β com PrP₁₀₆₋₁₂₆, però tot i contenir aquesta seqüència te un major número d'aminoàcids pel que el seu temps d'agregació i fibril·lació és més llarg.

1.2.1 Efecte de l'AChE en el procés d'agregació de PrP₈₂₋₁₄₆

Per estudiar l'habilitat de l'AChE per potenciar el procés d'assemblatge de PrP₈₂₋₁₄₆ curmarinada, es va seguir un procés experimental semblant al descrit per PrP₁₀₆₋₁₂₆. Com es pot observar a la figura 29, quan el pèptid es va incubar en absència de l'enzim la formació dels agregats es va produir de manera molt ràpida fins a una hora d'incubació. Transcorregut aquest període de temps la MMA és de $794 \pm 45 \mu\text{m}^2$, la qual cosa representa un 54 % del valor màxim de MMA obtingut en una cinètica en absència d'AChE

En cap cas no es va observar la presència d'agregats fluorescents a les mostres realitzades amb *scrambled* PrP₈₂₋₁₄₆, ni en absència ni en presència d'AChE.

Quan es van dur a terme els experiments en presència de l'enzim (AChE $2,50 \mu\text{M}$), igual que en el cas de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ es va obtenir un significatiu i progressiu increment de la MMA i es va arribar als seus valors màxims transcorreguts entre 5 i 6 dies d'incubació ($6984 \pm 55 \mu\text{m}^2$ i $7490 \pm 78 \mu\text{m}^2$). Aquest valors són aproximadament set vegades més alts que els obtinguts en mostres control sense AChE al mateix temps d'incubació. Cal destacar que ja a una hora d'incubació, els valors de MMA eren un 230 % per sobre que els valors de les mostres incubades sense AChE.



A més a més, es va observar una correlació negativa entre les concentracions de PrP82-146 curmarinada i d'AChE. L'increment màxim dels valors de MMA va ser obtingut quan la ràtio de PrP82-146 era 50:1 ($3115 \pm 79 \%$; fig. 30).

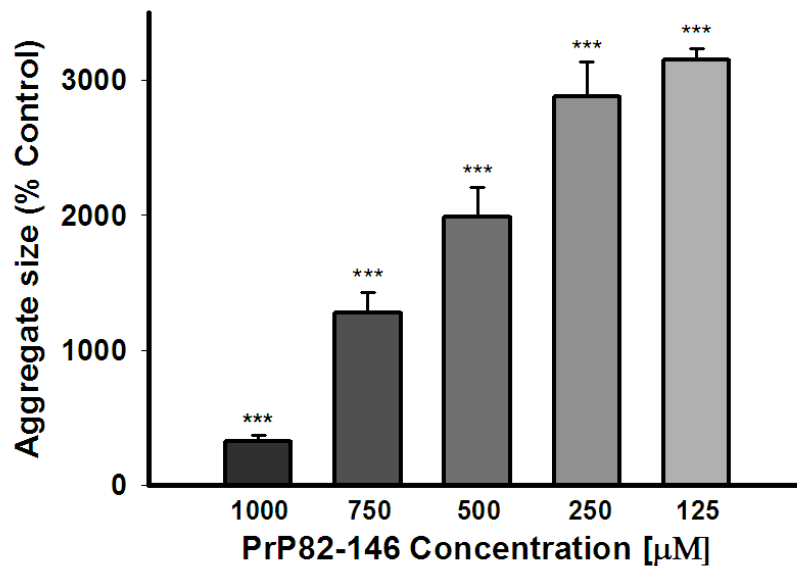
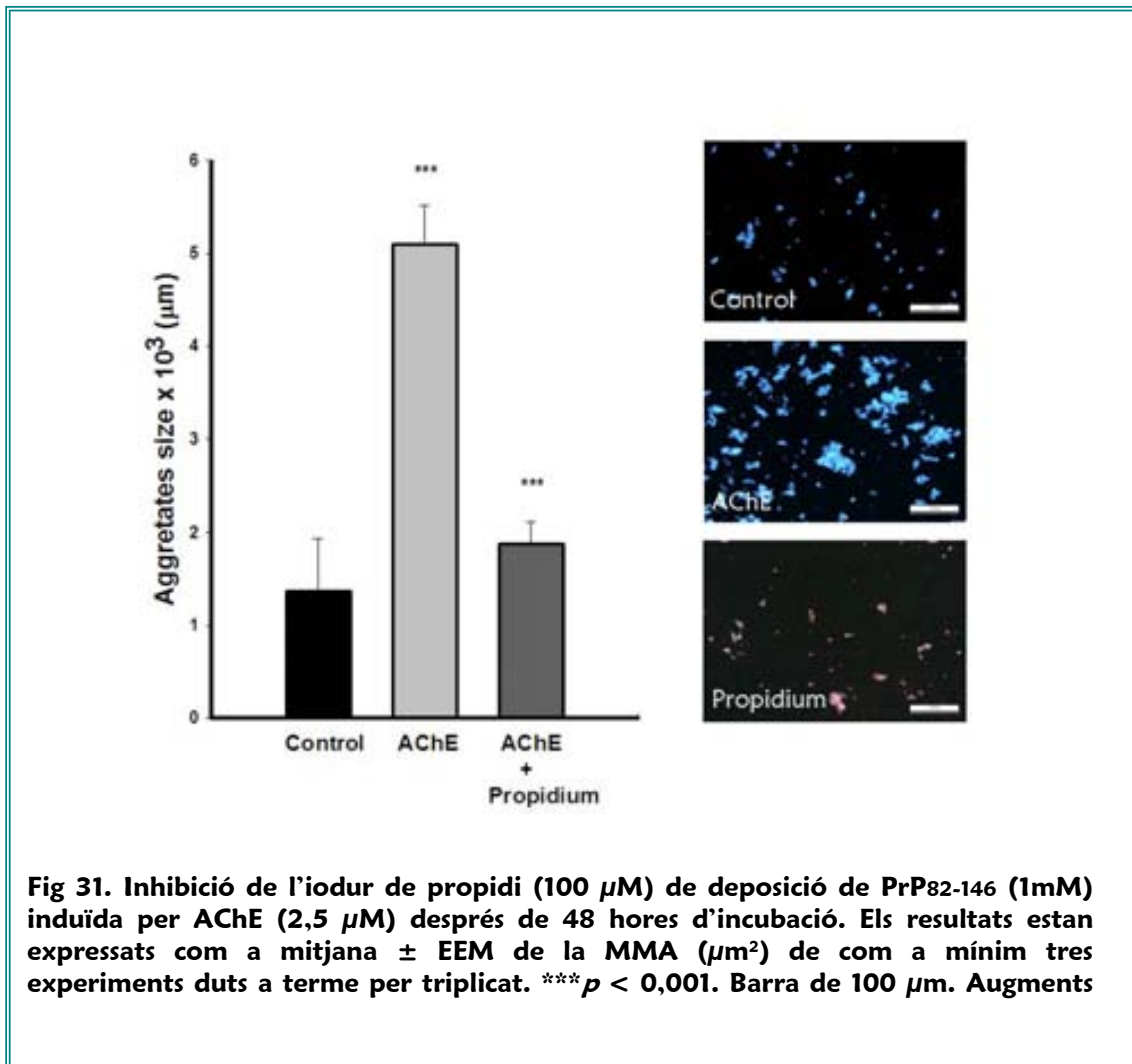


Fig 30. MMA obtinguda després de la incubació de PrP82-146 a diferents concentracions en presència d'AChE a una concentració constant (2,5 µM) en 100 mM Tris-HCl, a temperatura ambient. Els resultats s'expressen com a mitjana ± EEM del la MMA % dels valors control (mostres sense AChE) com a mínim de tres experiments duts a terme per triplicat. * < 0,001.**

La coincubació de PrP82-146, AChE i iodur de propidi (100 µM) durant 48 hores induïx una inhibició de l'agregació induïda per l'AChE de fins al 78 % ± 9 % (fig. 31) i aquest efecte es va mantenir constant en diferents temps d'incubació (0, 24, 48 i 72 hores)

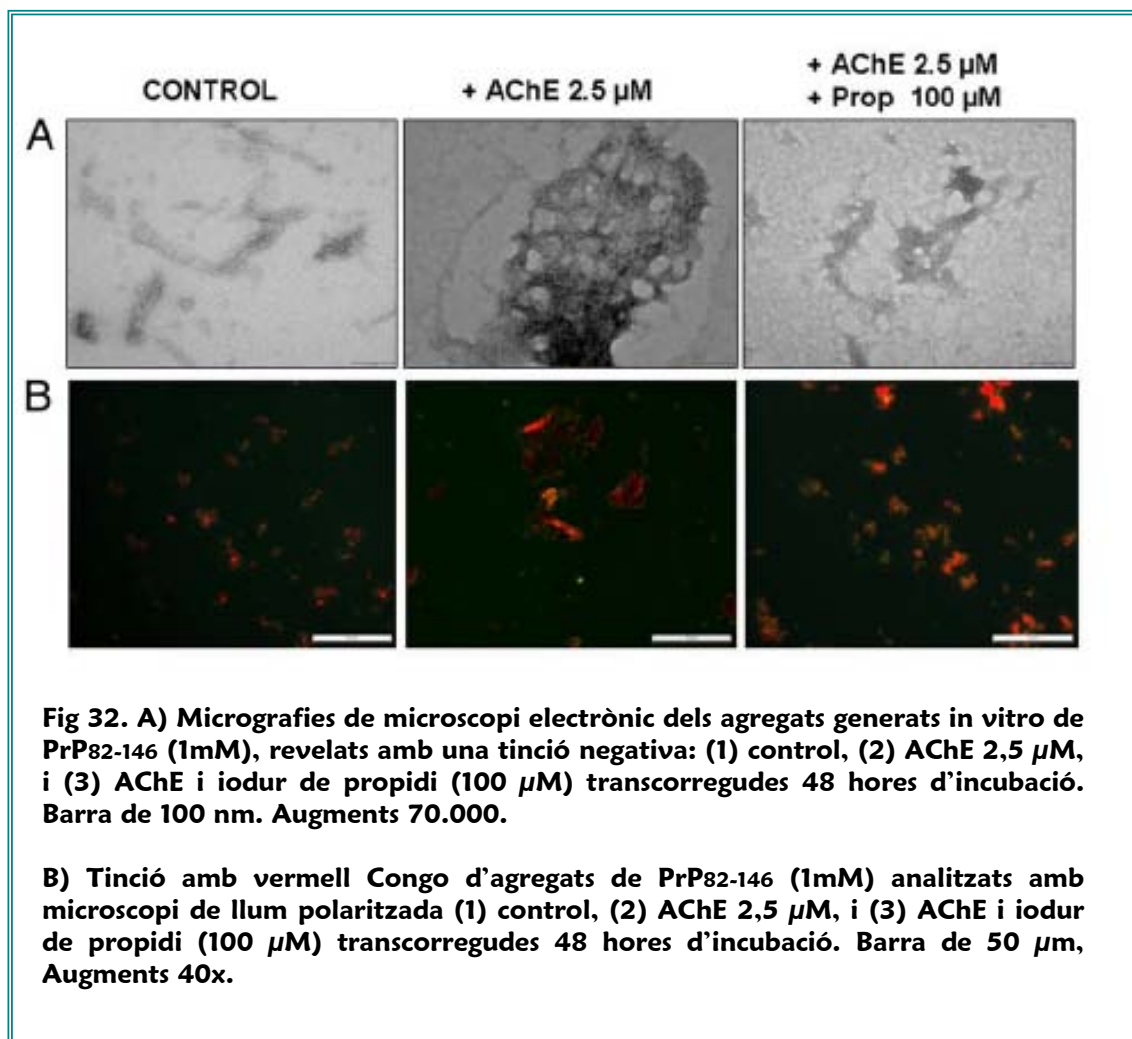


1.2.2 Anàlisi estructural dels agregats de PrP₈₂₋₁₄₆

Les propietats tintorials i d'ultraestructura dels agregats generats per PrP₈₂₋₁₄₆ en absència i presència d'AChE també van ser examinats sota llum polaritzada, microscòpia electrònica de transmissió i en aquest cas també es va analitzar el procés d'agregació a través del microscopi de força atòmica.

a) Microscopi de llum polaritzada: com es pot observar a la figura 32, els agregats macromoleculars de PrP₈₂₋₁₄₆ mostren propietats tintorials i òptiques d'estructures amiloides. Van mostrar birefringència en ser observades sota llum polaritzada

després de la tinció amb vermell Congo. Les propietats birefringents dels agregats eren més evidents quan l'AChE hi era present, atesa la seva major mida. Tanmateix, quan les mostres es van incubar en presència d'iodur de propidi (100 μM), inhibidor del lloc perifèric de l'AChE, la mida dels agregats es va reduir de forma considerable (fig. 32), d'acord amb el que havíem observat amb el microscopi de fluorescència.



b) Microscopi electrònic: l'estructura amiloide dels agregats també va ser confirmada amb l'anàlisi amb microscòpia electrònica. Tant amb AChE com sense,

els agregats de PrP82-146 tenyits negativament, estan compostos per fibres no ramificades entre 4–9 nm de diàmetre (fig. 32). La quantitat de fibres trobades a la gradeta va ser més gran quan les mostres havien estat incubades en presència de l'enzim, mentre que el nombre de fibres va disminuir en les mostres incubades prèviament amb iodur de propidi 100 μ M. Quan la *scrambled*- PrP82-146 va ser analitzada en les mateixes condicions no es van observar agregats.

c) Microscopi de força atòmica: les imatges de les mostres de PrP82-146 incubades a diferents temps ($t = 0, 24$ i 48 hores) en absència d'AChE van ser preses inicialment com a controls (fig. 33). A un temps d'incubació de 0 hores, petits punts de proteïna característics d'un procés de *dewetting* amb una ondulació petita (≤ 1 nm) van ser detectats. Aquestes petites illes distribuïdes a l'atzar sobre tota la superfície van ser assignades com a monòmers i /o oligòmers de PrP82-146.

Com es pot veure a la fig. 33, després de 24 hores d'incubació, els oligòmers comencen a agrupar-se, tot mantenint la seva morfologia nativa fins a una alçada de 2 nm. Aquest procés d'agregació també és reflectit en l'increment del recobriment de la superfície de la mica.

Després de 48 hores, una major agregació de les partícules indueixen gairebé el total recobriment de la superfície de mica. Simultàniament, es produeix la formació de nous punts (atribuïts a la nova formació d'oligòmers) a la superfície de la monocapa; en certes situacions aquests semblen capaços d'actuar com a precursors per a la formació de fibril·les.

Les imatges de MFA del procés d'agregació de PrP82-146 en presència d'AChE es mostren a la fig 33. Com es pot veure a la imatge, la presència d'AChE produeix canvis en el procés d'agregació fins i tot a temps 0 hores. Mentre en absència d'AChE apareixen petits punts de proteïna amb una petita ondulació (≤ 1 nm), la presència de l'AChE indueix la formació d'una nanoestructura en forma de panell de mel que arriba a alçades entre 2 i 4 nm.

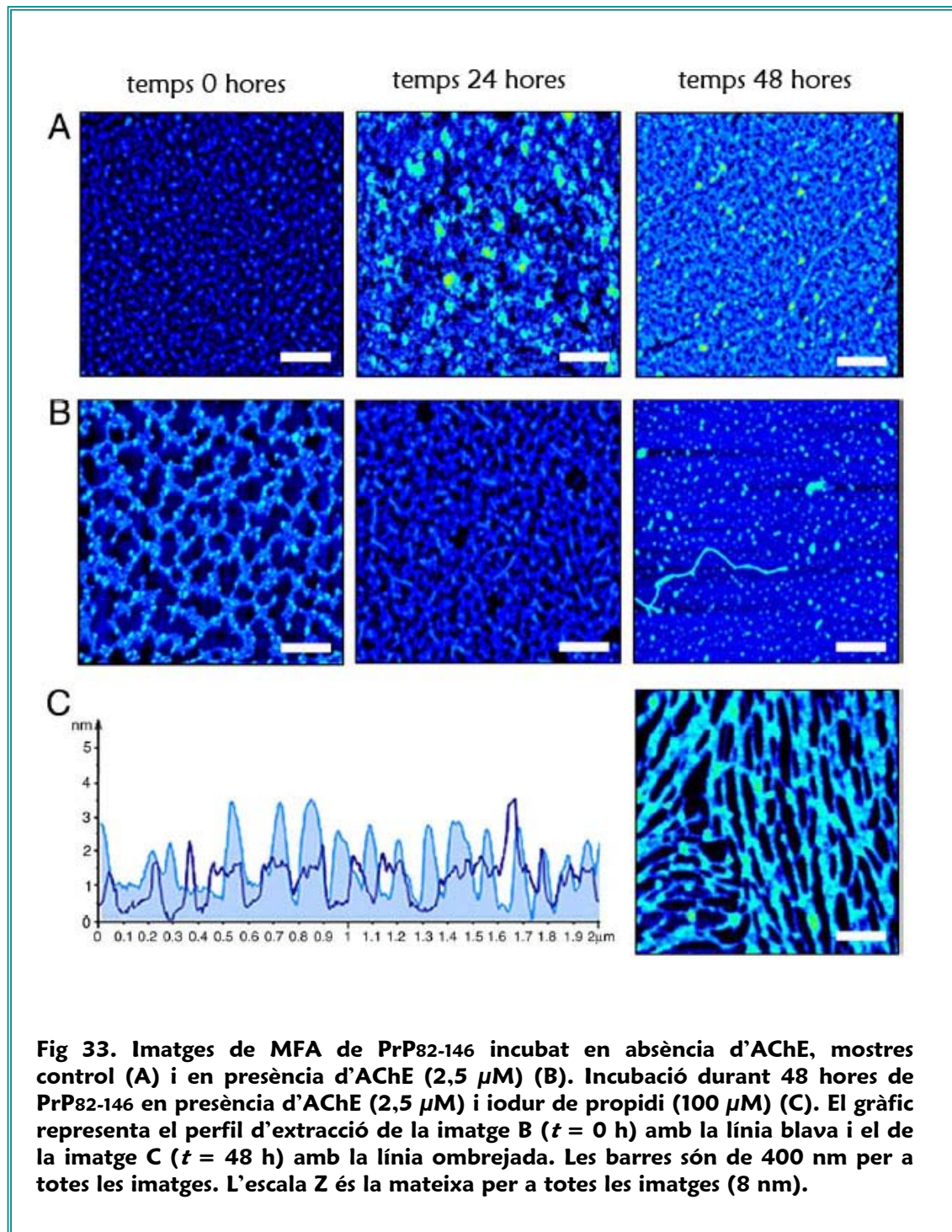


Fig 33. Imatges de MFA de PrP82-146 incubat en absència d'AChE, mostres control (A) i en presència d'AChE (2,5 μM) (B). Incubació durant 48 hores de PrP82-146 en presència d'AChE (2,5 μM) i iodur de propidi (100 μM) (C). El gràfic representa el perfil d'extracció de la imatge B ($t = 0$ h) amb la línia blava i el de la imatge C ($t = 48$ h) amb la línia ombrejada. Les barres són de 400 nm per a totes les imatges. L'escala Z és la mateixa per a totes les imatges (8 nm).

Després de 24 hores, les estructures amb una alçada de 2 nm han incrementat fins a cobrir de manera pràcticament total la superfície de la mica, tot mantenint-ne la morfologia nativa. En aquest punt es comença a apreciar la formació de petites fibres a la part superior de la capa proteica, d'uns 100 nm de longitud i entre 1–2 nm d'alçada. Finalment, al cap de 48 hores d'incubació s'ha produït un total recobriment de la superfície de mica, i ha incrementat de manera significativa tant el nombre com la llargària de les fibres.

Cal destacar que el patró d'agregació induït per l'AChE desapareix quan els experiments van ser duts a terme en presència d'iodur de propidi (inhibidor selectiu del lloc perifèric de l'AChE). A més a més, el patró d'agregació que s'observa després de 48 hores d'incubació en presència d'AChE i iodur de propidi és el mateix que s'observa a les mostres de PrP82-146 sense l'enzim a temps 0 hores (fig. 33).

2 ESTUDI DE L'EFECTE ANTIAGREGANT I ANÀLISI DEL PERFIL COLINÈRGIC DELS HETERODÍMERS HUPRINA-TACRINA Hup8TCI i Hup8TH

Degut als resultats obtinguts amb les huprines sobre l'agregació amiloidogènica es va analitzar l'efecte antiagregant de dos derivats de la huprina de caràcter heterodimèric dissenyats i sintetitzats amb l'objectiu d'interaccionar al mateix temps amb el lloc catalític i perifèric de l'AChE. Donat que aquests compostos eren de síntesi recent també es va estudiar el seu perfil colinèrgic: inhibició de les ChE, AChE i BChE, i la seva interacció sobre els receptors muscarínics.

2.1 Estudis d'inhibició de l'agregació de PrP₁₀₆₋₁₂₆ amb Hup8TCI i Hup8TH

Per dur a terme la determinació de l'efecte antiagregant d'aquests heterodímers es va seguir el mateix procediment descrit per a les huprines. El pèptid priònic es va incubar en presència d'una concentració fixa d'AChE 2,5 μM i es van afegir concentracions creixents, 0,1–100 μM , de Hup8TCI o Hup8TH.

Tots dos fàrmacs van mostrar un potencial inhibitori clar de l'agregació de PrP₁₀₆₋₁₂₆ induïda per AChE, i es redueix de manera contundent la mida dels agregats del pèptid priònic. Les dades obtingudes es van analitzar amb el GraphPad Prism program (GraphPad Software Inc., Califòrnia) i es van determinar les CI_{50} (concentració a la qual el fàrmac produeix una reducció del 50 % de la mida dels agregats). La CI_{50} pel Hup8TCL va ser de $0,26342 \pm 0,05 \mu\text{M}$ i de $0,06866 \pm 0,001 \mu\text{M}$ per Hup8TH. Les figures 34 i 35 representen la mitjana de la MMA i els percentatges d'inhibició de la mida dels agregats.

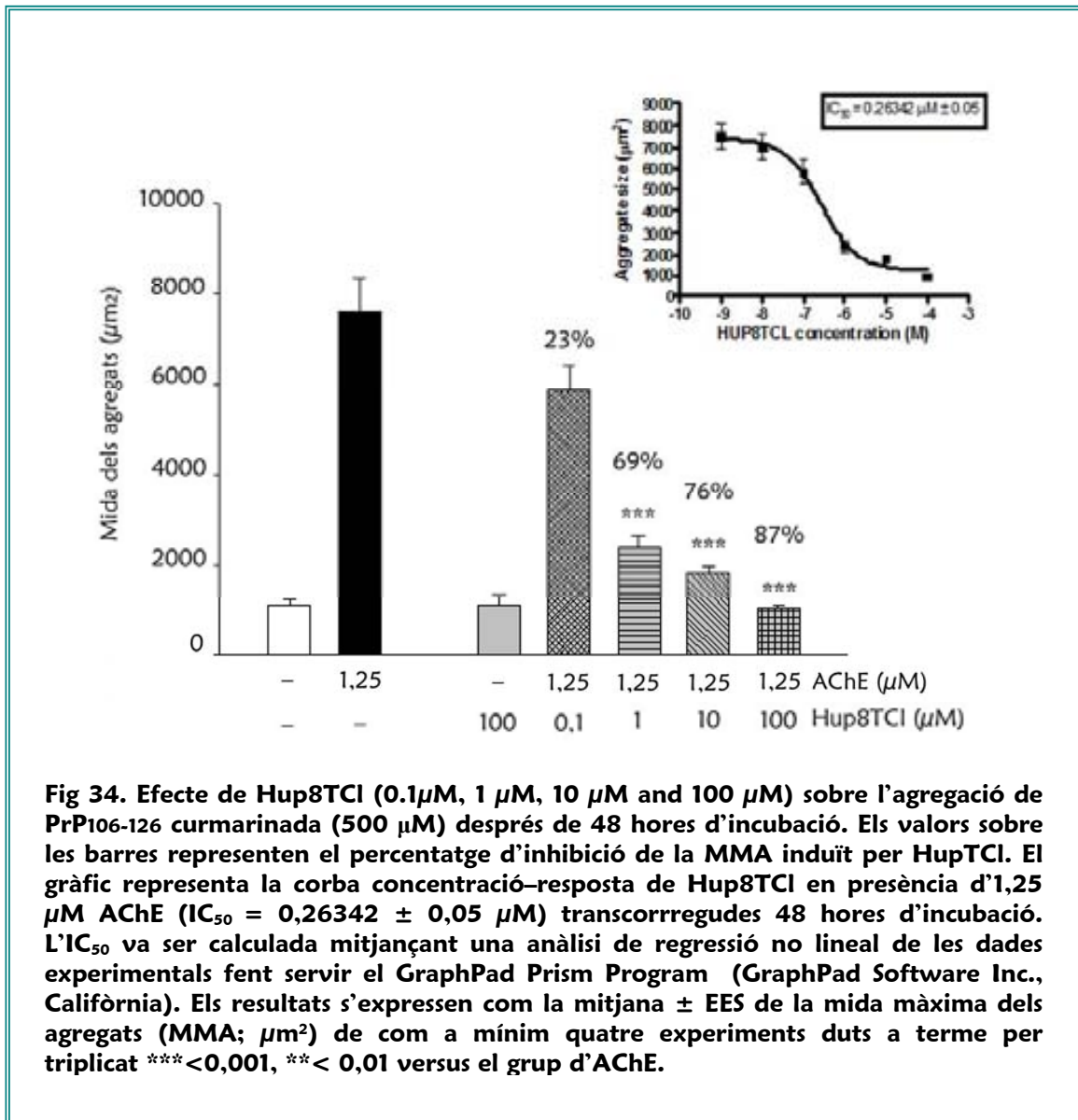


Fig 34. Efecte de Hup8TCL (0.1µM, 1 µM, 10 µM and 100 µM) sobre l'agregació de PrP106-126 curmarinada (500 µM) després de 48 hores d'incubació. Els valors sobre les barres representen el percentatge d'inhibició de la MMA induït per HupTCL. El gràfic representa la corba concentració-resposta de Hup8TCL en presència d'1,25 µM AChE (IC₅₀ = 0,26342 ± 0,05 µM) transcorregudes 48 hores d'incubació. L'IC₅₀ va ser calculada mitjançant una anàlisi de regressió no lineal de les dades experimentals fent servir el GraphPad Prism Program (GraphPad Software Inc., Califòrnia). Els resultats s'expressen com la mitjana ± EES de la mida màxima dels agregats (MMA; µm²) de com a mínim quatre experiments duts a terme per triplicat *<0,001, **< 0,01 versus el grup d'AChE.**

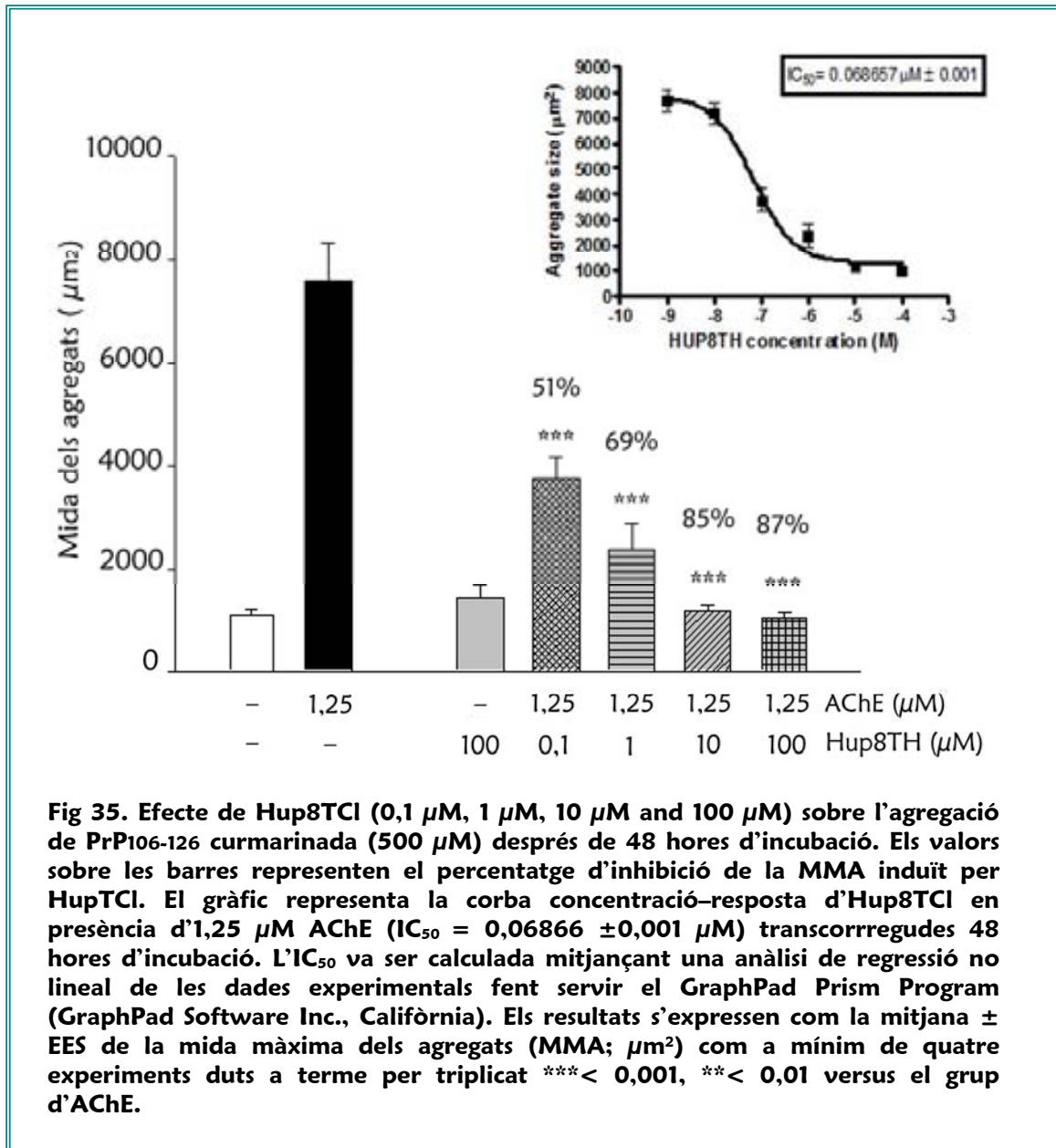


Fig 35. Efecte de Hup8TH (0,1 µM, 1 µM, 10 µM and 100 µM) sobre l'agregació de PrP106-126 curmarinada (500 µM) després de 48 hores d'incubació. Els valors sobre les barres representen el percentatge d'inhibició de la MMA induït per Hup8TH. El gràfic representa la corba concentració-resposta d'Hup8TH en presència d'1,25 µM AChE (IC₅₀ = 0,06866 ± 0,001 µM) transcorregudes 48 hores d'incubació. L'IC₅₀ va ser calculada mitjançant una anàlisi de regressió no lineal de les dades experimentals fent servir el GraphPad Prism Program (GraphPad Software Inc., Califòrnia). Els resultats s'expressen com la mitjana ± EES de la mida màxima dels agregats (MMA; µm²) com a mínim de quatre experiments duts a terme per triplicat * < 0,001, ** < 0,01 versus el grup d'AChE.**

2.2 Determinació de l'activitat anticolinesteràsica in vitro

A continuació es va procedir a determinar la CI₅₀ dels fàrmacs, és a dir, la concentració necessària que cal per inhibir l'activitat màxima de l'enzim en un 50%. Les corbes d'inhibició es van determinar per triplicat incubant com a mínim dotze concentracions de l'inhibidor durant quinze minuts, i es va fer un mínim de sis experiments per cada fàrmac. Com a controls es van fer servir solucions en

absència dels fàrmacs inhibidors, la qual cosa representaria la màxima activitat enzimàtica (100 %), i es va calcular el percentatge d'inhibició de l'enzim per cadascuna de les concentracions del fàrmac. Els mateixos experiments es van dur a terme per a la tacrina, la huperzina A i la huprina Y per poder comparar les dades obtingudes amb els heterodímers amb els compostos inicials dels quals deriven.

A la taula 3 es representen els valors de CI₅₀, així com les dades comparant la inhibició de l'AChE humana enfront de l'AChE bovina i la BuChE humana per Hup8TH, Hup8TCI, huprina Y, huperzina A i tacrina, utilitzant els tres últims com a compostos de referència. Els dos heterodímers es van mostrar més actius que els tres compostos de referència per inhibir l'AChE. Tots mostren una capacitat inhibidora major sobre l'activitat de la BChE que els compostos de referència, però cal destacar que presenten una major activitat sobre l'AChE que sobre la BChE. A més a més, tots dos mostren una major selectivitat per l'AChE humana que per l'enzim boví.

Taula 3. Activitat inhibidora in vitro dels heterodímers Hup8TH, Hup8TCI i de la huprina Y, la huperzina A i la tacrina sobre l'activitat dels enzims AChE i BChE.

Compost	n	R	CI ₅₀ (nM) AChE bovina	CI ₅₀ (nM) AChE humana	CI ₅₀ (nM) BChE humana
(±)-Hup8TH	8	H	1,26 ± 0,13	0,33 ± 0,01	4,74 ± 0,09
(±)-Hup8TCI	8	Cl	2,09 ± 0,11	0,4 ± 0,03	7,80 ± 0,07
(±)-Huprina Y	8		4,23 ± 0,86	0,78 ± 0,02	236 ± 9
(-)-Huperzina-A	8		74,0 ± 5,5	260 ± 18	> 10000
Tacrina	8		130 ± 10	205 ± 18	43,9 ± 17

Les dades representen la mitjana ± EEM del nombre d'experiments indicats (n), realitzats per triplicat.

2.3 Estudis de fixació de radiol·ligands als receptors muscarínics

2.3.1 Estudis de fixació de radiol·ligands als receptors muscarínics M1

a) *Estudis de saturació:* mitjançant els estudis de saturació es va estudiar la fixació específica de la [³H]-pirenzepina, antagonista dels receptors muscarínics M1. Aquests experiments van permetre determinar la fixació del radiol·ligand en preparacions de membranes obtingudes a partir d'hipocamp de rata, informació necessària per analitzar les corbes de desplaçament que es determinen a continuació.

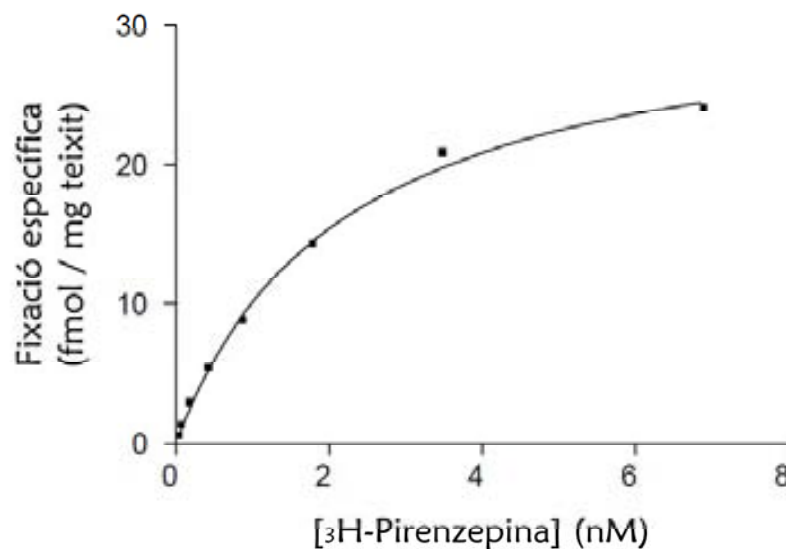


Fig 36. Fixació de [³H]-pirenzepina a membranes d'hipocamp de rata: experiment de saturació representatiu. A l'eix d'ordenades s'ha representat la fixació específica, obtinguda en fer la diferència entre la fixació total i la fixació inespecífica. En absisses es representa la concentració nM de radiol·ligand utilitzada.

La fixació de [³H]-pirenzepina als receptors M1 va ser un procés saturable i d'alta afinitat (de l'ordre nM). A més a més, l'anàlisi de les corbes obtingudes per saturació no lineal va indicar la presència d'una població homogènia de receptors en les preparacions utilitzades. Les anàlisis posteriors de saturació mitjançant la regressió de Hill va donar un coeficient de Hill proper a la unitat, la qual cosa va

indicar que no hi havia cooperativitat en la fixació del radiolligand i va confirmar que la [³H]-pirenzepina es fixava a una única població de receptors. El valor obtingut per la constant de dissociació K_D del radiolligand després de realitzar cinc experiments independents, cadascú per triplicat va ser d' $1,75 \pm 0,21$ nM; el nombre màxim de llocs de fixació B_{max} fou igual a $25,51 \pm 3,60$ fmol/mg teixit. A la figura 36 es mostra una figura representativa dels experiments de saturació amb [³H]-pirenzepina a partir dels quals es van obtenir aquestes dades.

b) *Estudis de competició*: en els experiment de competició es va valorar la capacitat d'Hup8TCl i Hup8TH per desplaçar la fixació específica de la pirenzepina als receptors M1. Amb aquesta finalitat les preparacions de membranes es van incubar amb una concentració de [³H]-pirenzepina propera a la K_D , prèviament obtinguda en els experiments de saturació, juntament amb concentracions creixents dels fàrmacs objecte d'estudi.

Ambdós compostos van inhibir de forma completa la fixació específica de la [³H]-pirenzepina als receptors muscarínics M1. les corbes de desplaçament van ser monofàsiques amb un coeficient de Hill no significativament diferent de la unitat. Gràcies a l'ajust de regressió lineal realitzat amb el programa informàtic GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Califòrnia), es va comprovar que efectivament el model s'adaptava a un sol lloc de fixació (població homogènia de receptors) i es van obtenir valors de CI_{50} i K_i (constant d'inhibició de la fixació de la [³H]-pirenzepina a cadascun dels heterodímers); es poden observar a la taula 4. Com es pot veure a la taula no hi ha diferències significatives en l'afinitat dels dos heterodímers pels receptors muscarínics M1, tots dos tenen una elevada afinitat en el rang nM.

Taula 4. Paràmetres obtinguts a partir de les corbes de fixació als receptors muscarínics M1 de la [³H]-pirenzepina realitzada per Hup8TCl i Hup8TH.

FÀRMAC	CI50 nM	Ki	n
Hup8TCl	4,4 ± 0,5	2,1 ± 0,24	4
Hup8TH	8,4 ± 0,88	8,3 ± 0,87	5

CI50: concentració nanomolar del fàrmac que produeix un 50 % d'inhibició de la fixació específica del radiolligand als receptors.

Ki: constant d'inhibició.

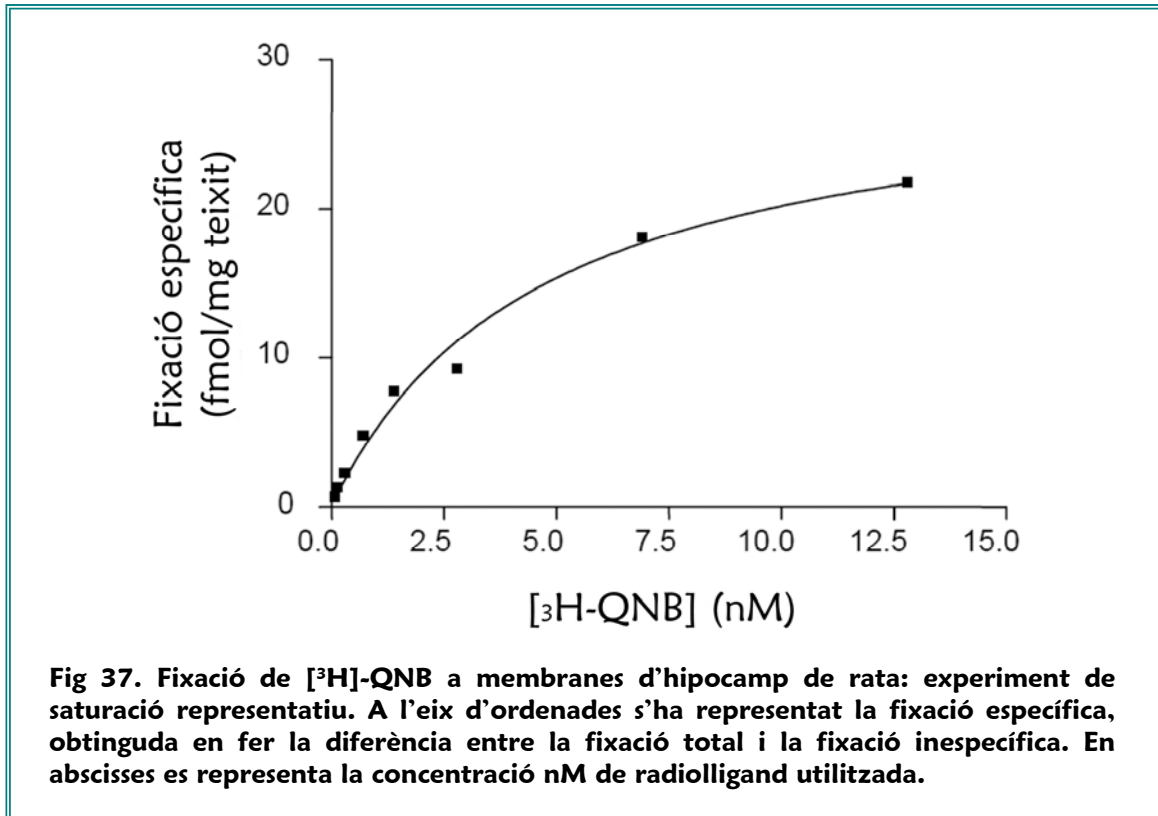
n: nombre d'experiments fets per triplicat. Els valors representen la mitjana dels resultats ± EEM.

2.3.2 Estudis de fixació de radiolligands als receptors muscarínics M2

a) *Estudis de saturació:* en els estudis de saturació sobre els receptors muscarínics M2 es va utilitzar com a radiolligand el [³H]-QNB, antagonista específic dels receptors muscarínics, juntament amb una quantitat fixa de pirenzepina (10 μM) a fi de bloquejar els receptors M1. De nou els experiments de saturació van permetre caracteritzar la fixació d'aquest radiolligand a preparacions de membrana d'hipocamp de rata.

La fixació de [³H]-QNB als receptors muscarínics va ser un procés saturable i d'alta afinitat (de l'ordre nM). A més a més, l'anàlisi de les corbes obtingudes per saturació no lineal va indicar la presència d'una població homogènia de receptors en les preparacions utilitzades. Les anàlisis de saturació posteriors mitjançant la regressió de Hill va donar un coeficient de Hill proper a la unitat, la qual cosa va indicar que no hi havia cooperativitat en la fixació del radiolligand i va confirmar que la [³H]-QNB es fixava a una única població de receptors. El valor obtingut per la constant de dissociació K_D del radiolligand després de fer cinc experiments independents, cadascun per triplicat va ser de $4,63 \pm 0,91$ nM. El nombre màxim de llocs de fixació B_{max} fou igual a $29,56 \pm 2,44$ fmol/mg teixit. A la figura 37 es

mostra una corba representativa dels experiments de saturació amb [^3H]-QNB a partir dels quals es van obtenir aquestes dades.



b) *Estudis de competició:* en aquest cas es va estudiar la capacitat dels heterodímers, Hup8TCl i Hup8TH, per desplaçar la fixació de [^3H]-QNB, juntament amb una concentració fixa de pirenzepina freda, els receptors muscarínics M2. Les dades es van processar d'igual manera que en els estudis dels receptors M1 (taula 5).

L'afinitat d'aquests heterodímers pels receptors M2 és més baixa que pels receptors M1, molt més propera a l'ordre micromolar que no pas al nanomolar, que és el rang en què tenen afinitat pels receptors muscarínics M1.

Taula 5. Paràmetres obtinguts a partir de les corbes de fixació als receptors M2 de la [3H]-QNB juntament amb pirenzepina realitzada per Hup8TCI i Hup8TH.

FÀRMAC	CI50 nM	Ki	n
Hup8TCI	330 ± 23	290 ± 13	4
Hup8TH	170 ± 31	200 ± 9	4

CI50: concentració nanomolar del fàrmac que produeix un 50 % d'inhibició de la fixació específica del radiolligand als receptors.

Ki: constant d'inhibició.

n: nombre d'experiments fets per triplicat. Els valors representen la mitjana dels resultats ± EEM.

3. ESTUDIS DE NEUROPROTECCIÓ

3.1 Supervivència cel·lular

Atès que s'ha demostrat que la huperzina A, un dels components parentals dels quals deriven les huprines, mostra efectes neuroprotectors un altre dels nostres objectius va ser estudiar el possible efecte protector de les huprines en front a l'agressió cel·lular induïda per H_2O_2 . Amb aquest objectiu es va utilitzar la reducció del MTT a formazan el cèl·lules vives. Es van realitzar aquests experiments en dos abordatges experimentals cel·lular: cèl·lules PC12 no diferenciades i cèl·lules PC12 diferenciades amb NGF donat que aquestes últimes presenten característiques similars a les cèl·lules neuronals. En presència de les huprines X, I i Z (1 i 0,1 μM) es va observar un increment significatiu de la supervivència cel·lular enfront a l'obtinguda amb H_2O_2 sol. Tanmateix, a concentracions més elevades (100 i 10 μM) les huprines mostraren una reducció de dita viabilitat cel·lular (dades no presentades).

3.1.1 Cèl·lules PC12

Les cèl·lules es van exposar durant dues hores a H_2O_2 (200 μM); després d'aquesta incubació es va analitzar la formació de formazan observant-se una marcada disminució en la supervivència cel·lular. En un primer moment les cèl·lules es van preincubar (prèviament a l'addició de l' H_2O_2) durant una i dues hores amb les huprines. Amb aquests temps de preincubació les huprines no van exercir cap mena d'efecte neuroprotector (dades no mostrades). Atesos aquests resultats, es va procedir a preincubar les cèl·lules durant períodes de temps més llargs: 24 i 48 hores, donat que altres compostos han mostrat l'efecte neuroprotector únicament quan son incubats durant un període prolongat de temps.

El pretractament de 24 hores de les cèl·lules amb huprines X, I i Z (0,01 – 1 μM) previ a l'exposició al H_2O_2 indueix un percentatge de protecció en un rang entre

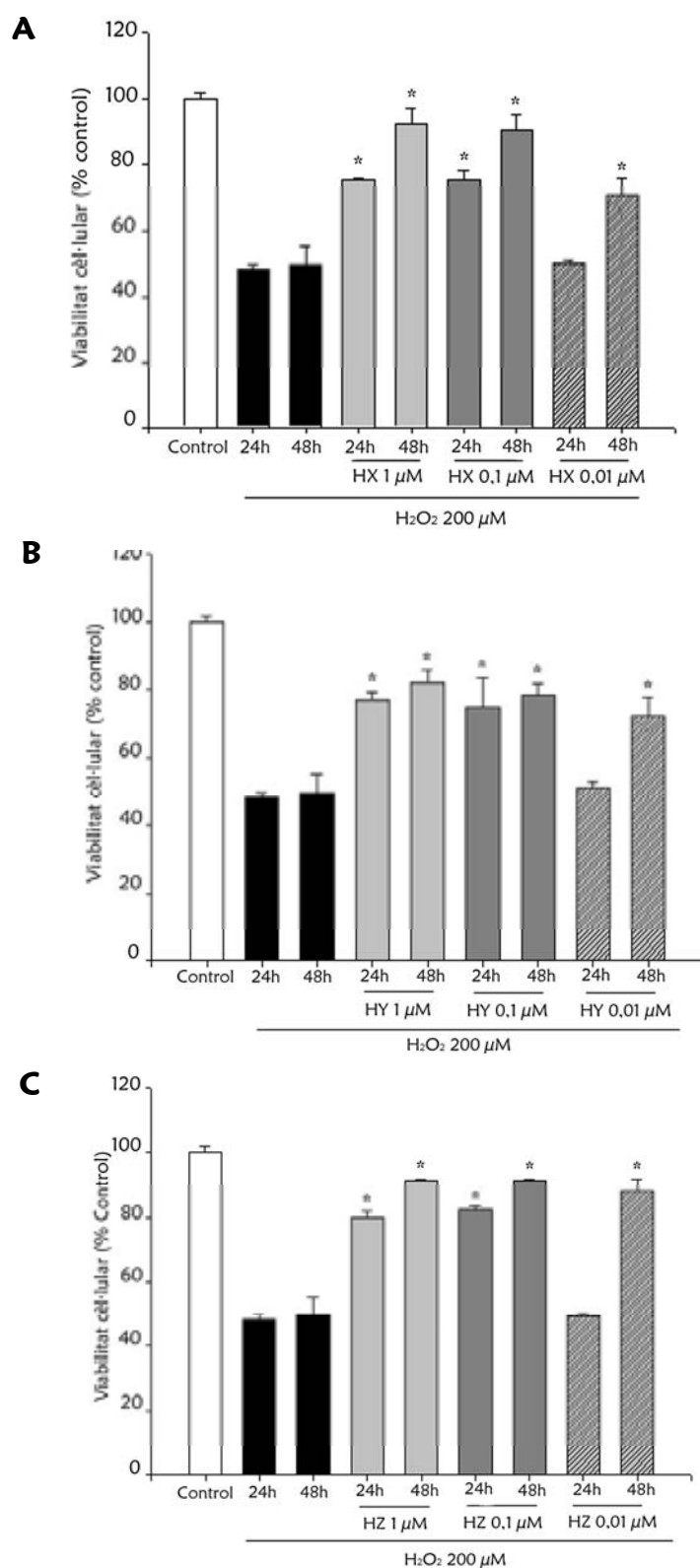


Fig 38. Atenuació del dany cel·lular induït per l'H₂O₂ en cèl·lules PC12, utilitzant diferents huprines: A) huprina X (HX), B) huprina Y (HY) i C) huprina Z (HZ). Les cèl·lules es van incubar durant dues hores en presència de 200 μM de H₂O₂. Les huprines es van afegir al medi 24 i 48 hores abans de l'addició de H₂O₂. La viabilitat cel·lular es va mesurar quantificant la reducció del MTT. Com a mínim es van dur a terme quatre o més experiments per triplicat. Les dades s'expressen en mitjanes ± EEM com a % del valor control. * < 0,05 comparat amb el grup tractat només amb H₂O₂ (Dunnett's test).

47–65 %. A la concentració de 0,01 μM d'huprines no es va observar neuroprotector (taula 6). Tanmateix, quan el període de pretractament es va incrementar fins a 48 hores, es va produir un augment significatiu del percentatge de protecció a totes les concentracions estudiades.

L'efecte sobre la viabilitat cel·lular del tractament amb H_2O_2 i del pretractament amb huprines i l'exposició posterior a H_2O_2 es pot observar a la figura 38. Aquestes dades posen de manifest que el temps de preincubació és determinant perquè les huprines puguin dur a terme el seu efecte neuroprotector. Podria ser que la presència de les huprines activés una sèrie de processos que requereixen un cert temps perquè es completin, com per exemple l'expressió gènica i la síntesi proteica.

Taula 6. Efecte del pretractament amb huprines en la supervivència de les cèl·lules PC12 després de l'exposició de les cèl·lules a l' H_2O_2 .

TRACTAMENT	% PROTECCIÓ 24 HORES	% PROTECCIÓ 48 HORES
Huprina X (1 μM)	47 \pm 0,6 *	70 \pm 4,8 *
Huprina X (0,1 μM)	49 \pm 2,9 *	74 \pm 4,6 *
Huprina X (0,01 μM)	3 \pm 0,9	12 \pm 5,4 *
Huprina I (1 μM)	52 \pm 2,3 *	60 \pm 3,6 *
Huprina I (0,1 μM)	47 \pm 8,7 *	51 \pm 3,3 *
Huprina I (0,01 μM)	4 \pm 5,5	22 \pm 5,5 *
Huprina Z (1 μM)	62 \pm 2,2 *	65 \pm 0,5 *
Huprina Z (0,1 μM)	65 \pm 1,3 *	65 \pm 0,5 *
Huprina Z (0,01 μM)	0	27 \pm 3,7 *

Els valors s'expressen com a percentatges de protecció mitjana \pm EEM obtingut com a mínim de tres experiments independents duts a terme per triplicat. * < 0,05 comparat amb el grup tractat amb H_2O_2 (Dunnett's test).

Com que gràcies a estudis previs fets al nostre Departament es coneix la interacció de les huprines amb els receptors nicotínics i muscarínics, es va estudiar el possible efecte de la interacció de les huprines amb aquests receptors en la protecció cel·lular observada.

Amb aquesta finalitat es van utilitzar els antagonistes d'ambdós tipus de receptor: la mecamilamina (100 μM), que antagonitza de manera generalitzada tots els subtipus de receptors nicotínics, i l'atropina (0,01 μM), que antagonitza els receptors muscarínics. L'antagonització dels receptors es va dur a terme amb el tractament d'huprines a la concentració d'1 μM i amb 48 hores de preincubació, ja que són aquestes les condicions en les quals s'obtenen valors màxims de neuroprotecció.

L'antagonització dels receptors nicotínics i muscarínics en cèl·lules PC12 no diferenciades en cap cas no va afectar la neuroprotecció induïda per les huprines. Aquestes dades suggereixen que l'efecte neuroprotector de les huprines en aquestes cèl·lules no vindria donat per la interacció amb cap dels dos tipus de receptor. La taula 7 que hi ha a continuació mostra els percentatges de neuroprotecció obtinguts en els estudis fets amb els antagonistes nicotínics i muscarínics.

Taula 7. Efecte dels antagonistes dels receptors nicotínics (mecamilamina, Mec) i muscarínics (atropina, Atrp) sobre la neuroprotecció exercida per les huprines. Les cèl·lules es van pretractar amb huprines i antagonistes abans de l'addició d' H_2O_2 .

TRACTAMENT	% PROTECCIÓ AL CAP DE 48 HORES
Huprina X (1 μM)	69 \pm 4,9
Huprina X (1 μM) + Mec (100 μM)	68 \pm 0,5
Huprina X (1 μM) + Atrp (0,1 μM)	66 \pm 10,2
Huprina Y (1 μM)	67 \pm 3,4
Huprina Y (1 μM) + Mec (100 μM)	61 \pm 9,3
Huprina Y (1 μM) + Atrp (0,1 μM)	58 \pm 1,2
Huprina Z (1 μM)	60 \pm 4,6
Huprina Z (1 μM) + Mec (100 μM)	59 \pm 4,7
Huprina Z (1 μM) + Atrp (0,1 μM)	55 \pm 7,6

Els valors s'expressen com a percentatge de protecció mitjana \pm EEM obtingut com a mínim de tres experiments independents duts a terme per triplicat. * < 0,05 comparat amb el grup tractat amb H_2O_2 (Dunnett's test).

3.1.2 Cèl·lules PC12 diferenciades

Les cèl·lules PC12 són cèl·lules tumorals de feocromocitoma de rata. Deriven de la medul·la adrenal i tenen origen neural. Aquest origen permet diferenciar aquesta línia en cèl·lules neurals gràcies a un tractament amb el factor de creixement nerviós (NGF). Les cèl·lules diferenciades es van fer servir per dur a terme estudis de supervivència ja que són un model molt més similar a les cèl·lules nervioses humanes, que serien la diana terapèutica, per la que s'han sintetitzat aquests compostos.

Igual que les cèl·lules sense diferenciar, les PC12 diferenciades veuen reduïda la seva viabilitat cel·lular pràcticament fins al 50 % quan són exposades durant dues hores a H_2O_2 (200 μM). Prenent com a punt de partida els resultats obtinguts amb cèl·lules PC12 no diferenciades que mostren que la neuroprotecció exercida per les huprines, és major com més gran és el temps de preincubació amb aquests fàrmacs, les cèl·lules diferenciades es van preincubar amb les huprines X, Y i Z (0,1 – 1 μM) durant les 48 hores prèvies a l'addició de l' H_2O_2 .

Taula 8. Efecte del pretractament amb huprines en la supervivència de les cèl·lules PC12 diferenciades després de l'exposició de les cèl·lules a H_2O_2 .

TRACTAMENT	% PROTECCIÓ AL CAP DE 48 HORES
Huprina X (1 μM)	53 \pm 5 *
Huprina X (0,1 μM)	44 \pm 6 *
Huprina Y (1 μM)	56 \pm 5 *
Huprina Y (0,1 μM)	49 \pm 6 *
Huprina Z (1 μM)	56 \pm 7 *
Huprina Z (0,1 μM)	47 \pm 6 *

Els valors s'expressen com a percentatge de protecció mitjana \pm EEM obtingut com a mínim de tres experiments independents duts a terme per triplicat. * < 0,05 comparat amb el grup tractat amb H_2O_2 (Dunnett's test).

Aquest tractament indueix un percentatge de neuroprotecció en un rang entre 44–55 % en totes les huprines a les concentracions d'1 i 0,1 μM (taula 8).

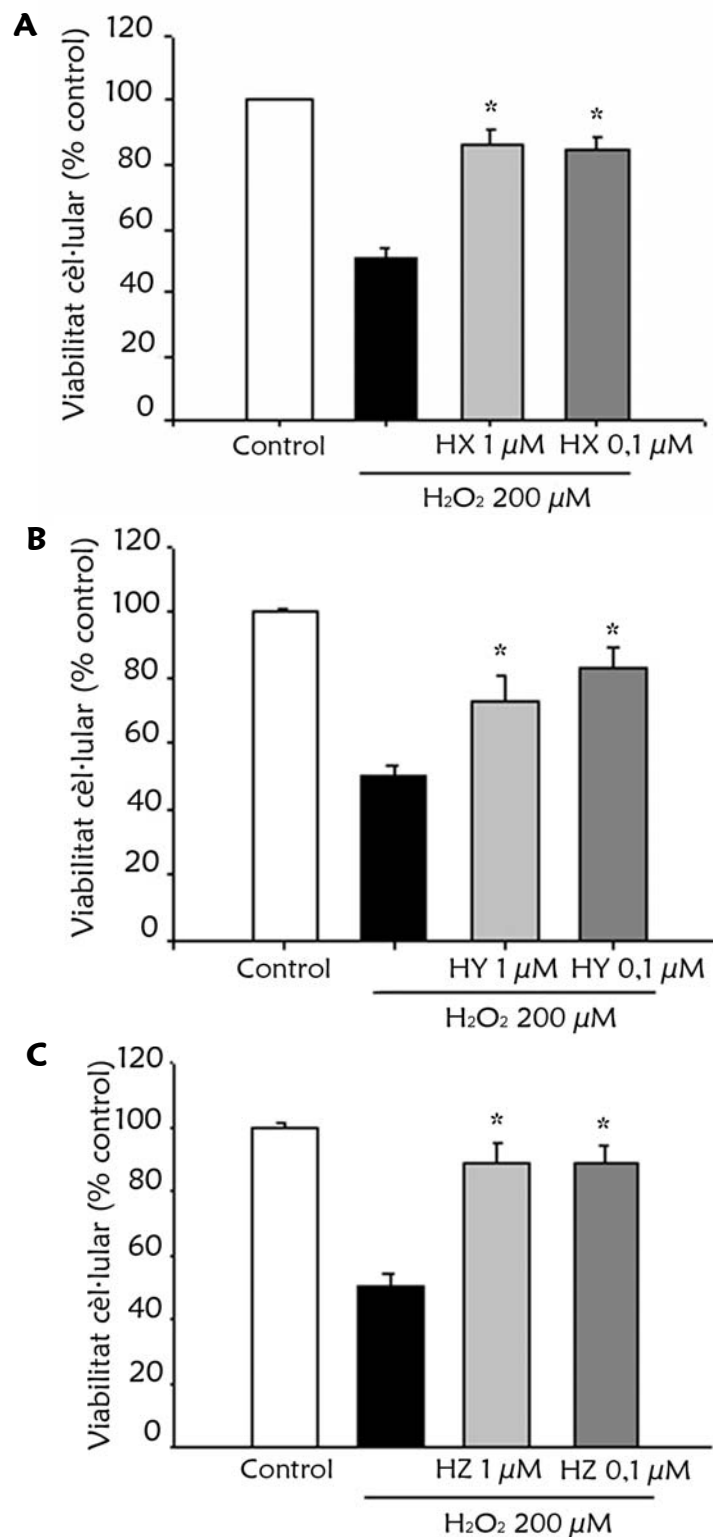


Fig 39. Atenuació del dany cel·lular induït per l'H₂O₂ en cèl·lules PC12 diferenciades amb NGF, per diferents huprines: A) huprina X (HX), B) huprina Y (HY) i C) huprina Z (HZ). Les cèl·lules es van incubar durant dues hores en presència de 200 μM de H₂O₂. Les huprines es van afegir al medi 24 i 48 hores abans de l'addició d'H₂O₂. La viabilitat cel·lular es va mesurar quantificant la reducció del MTT. Com a mínim es van dur a terme tres experiments per triplicat. Les dades s'expressen en mitjanes ± EEM com a percentatge del valor control. * < 0,05 comparat amb el grup tractat només amb H₂O₂ (Dunnett's test).

A la figura 39 es representa l'efecte de l'H₂O₂ sol o bé amb pretractament previ amb les huprines X, Y i Z (0,01–1 µM).

També es va estudiar si l'efecte neuroprotector de les huprines en cèl·lules PC12 diferenciades era fruit de la interacció d'aquests fàrmacs amb els receptors muscarínics o nicotínics. Amb aquest objectiu es van antagonitzar els receptors nicotínics i muscarínics amb mecamilamina 100 µM o atropina 0,1 µM tal com es detalla a l'apartat anterior.

La presència de mecamilamina reverteix de manera significativa l'efecte neuroprotector de totes les huprines, disminuint entre un 39–59 % el percentatge de neuroprotecció de les huprines davant l'H₂O₂ (taula 9). Aquesta reducció de la protecció exercida pels fàrmacs en presència de mecamilamina indica la possible participació dels receptors nicotínics en el procés de neuroprotecció. S'ha demostrat que les cèl·lules PC12 diferenciades expressen una major quantitat de

Taula 9. Efecte dels antagonistes dels receptors nicotínics (mecamilamina Mec) i muscarínics (atropina Atrp) sobre la neuroprotecció exercida per les huprines. Les cèl·lules es van pretractar amb huprines i antagonistes abans de l'addició d'H₂O₂.

TRACTAMENT	% PROTECCIÓ AL CAP DE 48 HORES
Huprina X (1 µM)	63 ± 5,4
Huprina X (1 µM) + Mec (100 µM)	7 ± 3,2 *
Huprina X (1 µM) + Atrp (0,1 µM)	32 ± 2,7 *
Huprina Y (1 µM)	61 ± 5,5
Huprina Y (1 µM) + Mec (100 µM)	2,3 ± 0,9 *
Huprina Y (1 µM) + Atrp (0,1 µM)	16 ± 1,6 *
Huprina Z (1 µM)	56 ± 5,2
Huprina Z (1 µM) + Mec (100 µM)	17 ± 3,4 *
Huprina Z (1 µM) + Atrp (0,1 µM)	27 ± 7,1 *

Els valors s'expressen com a percentatge de protecció mitjana ± EEM obtingut com a mínim de tres experiments independents duts a terme per triplicat. * < 0,05 comparat amb el grup tractat amb H₂O₂ (Dunnett's test).

receptors nicotínics que les indiferenciades (Burstein and Greene, 1978; Greene and Tischler, 1976; Vaudry et al., 2002), cosa que podria explicar les diferències obtingudes en els resultats amb l'un i l'altre tipus cel·lular. L'antagonització dels receptors muscarínics amb atropina també indueix una destacada reducció de la neuroprotecció, amb disminucions del percentatge de protecció entre el 29–45 %. Així doncs, els receptors muscarínics també estarien implicats en la neuroprotecció exercida per les huprines en aquest tipus cel·lular.

Aquestes dades ens indiquen que, clarament els receptors colinèrgics, tant els nicotínics com els muscarínics estarien implicats d'alguna manera en l'efecte neuroprotector de les huprines en aquest cas.

3.2 Determinació de l'activitat superòxid dismutasa

Una vegada fets els estudis de viabilitat cel·lular, es van estudiar els possibles efectes de les huprines sobre l'enzim superòxid dismutasa. Aquest participa en la destoxificació dels radicals lliures mitjançant la catàlisi de l'anió superòxid a peròxid d'hidrogen i oxigen. Com hem pogut observar amb els estudis de reducció de MTT, les huprines protegeixen front als radicals lliures d'oxigen, però no sabem mitjançant quina via. Una de les possibilitats seria la modulació de l'activació o l'expressió de la superòxid dismutasa que participa en aquest procés de destoxificació, per aquest motiu vam determinar si les huprines tenien algun efecte sobre aquest enzim.

3.2.1 Cèl·lules PC12

L'exposició de les cèl·lules PC12 durant dues hores a H_2O_2 (200 μM), va produir una marcada disminució de l'activitat de la SOD, si ho comparem amb les cèl·lules control. El pretractament de 48 hores de les cèl·lules amb huprines X, Y i Z (0,01–1 μM) previ a l'exposició al H_2O_2 va incrementar de manera significativa l'activitat de la SOD en un rang entre el 24–86 % comparant amb el grup control (fig. 40). Aquest augment de l'activitat de la SOD en les concentracions d'1 i 0,1 μM , fins i

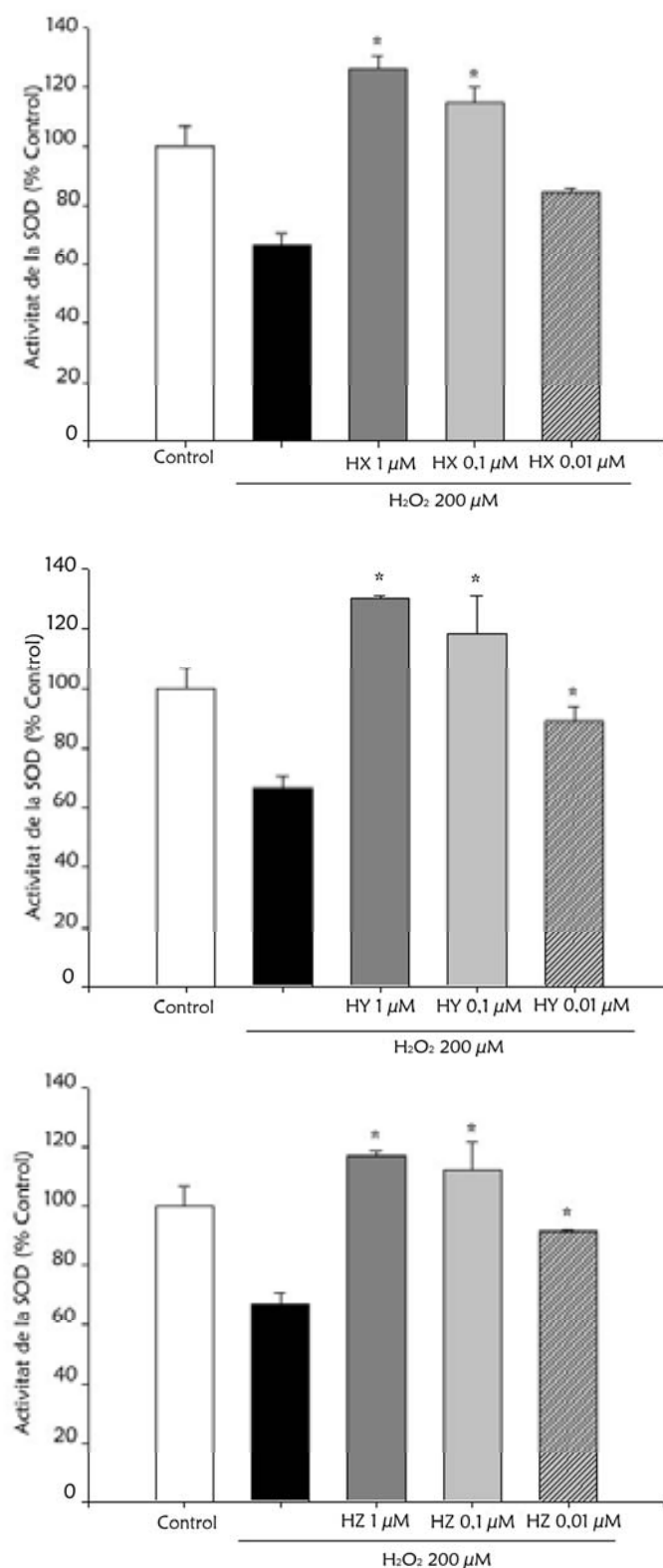


Fig 40. Efectes de A) huprina X (HX), B) huprina Y (HY) i C) huprina Z (HZ) en l'activitat de la superòxid dismutasa (SOD) en cèl·lules PC12. Les cèl·lules es van incubar amb 200 μM de H₂O₂ durant dues hores. Les huprines es van afegir 48 hores abans de l'addició de l'H₂O₂. Els valors de l'activitat de la SOD són unitats arbitràries (mitjana ± EEM) obtingudes d'un joc d'assaig de la SOD. Com a mínim es van fer tres experiments duts a terme per triplicat. *<0,05 comparat amb el grup d'H₂O₂ (Dunnett's test).

tot pot arribar a superar els nivells d'activitat de la SOD en cèl·lules control. L'increment de l'activitat de la SOD podria estar relacionat amb l'efecte neuroprotector de les huprines enfront de l'H₂O₂, que és un agent oxidant.

3.2.2 Cèl·lules PC12 diferenciades

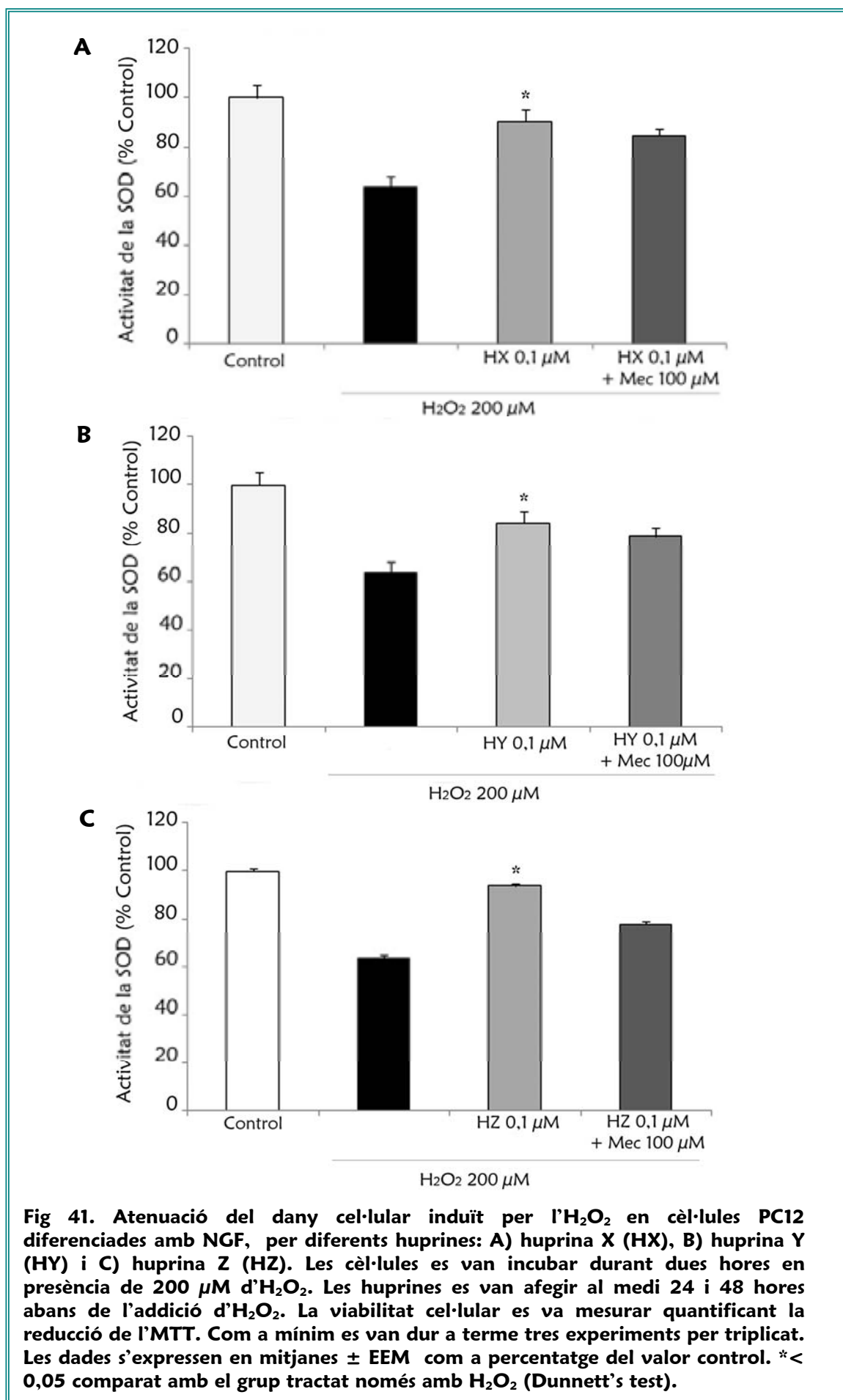
Els efectes de les huprines observats en cèl·lules PC12 diferenciades és molt similar al que se obté en cèl·lules no diferenciades. L'exposició durant dues hores produeix un increment marcat de l'activitat de l'enzim, mentre que la preincubació amb huprines reverteix aquesta disminució i produeix un augment marcat en l'activitat enzimàtica.

Aquesta potenciació de l'activitat de la SOD s'observa amb el tractament amb totes les huprines i a totes les concentracions testades (1 i 0,1 μ M) (fig. 41).

Atès que en els estudis de viabilitat cel·lular fets amb cèl·lules PC12 diferenciades es va observar una potent reversió de neuroprotecció induïda per les huprines en presència de mecamilamina, aquest antagonista també es va incloure en els experiments de determinació de l'activitat enzimàtica de la SOD.

L'objectiu és veure si la potenciació dels receptors nicotínics per part de les huprines està relacionat amb l'increment d'activitat de la SOD que s'observa a les cèl·lules tractades amb aquests fàrmacs.

Els resultats obtinguts mostren una lleugera tendència de disminució de l'activitat superòxid dismutasa en presència de mecamilamina 100 μ M, però aquesta diferència no assoleix la significació (fig. 41). Aquests resultats indicarien que la modulació de l'activitat de la SOD no vindria únicament donada per la interacció de les huprines amb els receptors nicotínics. Això suggereix la participació d'altres vies en l'efecte protector de les huprines que podrien regular el procés d'activació o expressió de la SOD.





LA MORT I LA VIDA Gustav Klimt

DISCUSSIÓ

La hipòtesi colinèrgica, com a causa de la disfunció cognitiva existent en els processos neurodegeneratius de la malaltia d'Alzheimer, ha determinat que les aproximacions farmacològiques per al seu tractament hagin estat basades clàssicament en la facilitació de la neurotransmissió colinèrgica en diferents nivells. Entre els compostos emprats en el tractament simptomàtic de la MA, els IACHe (Munoz-Torrero, 2008; Pepeu i Giovannini, 2009) són els que han estat més útils; tanmateix, l'existència de compostos d'eficàcia limitada i múltiples efectes indesitjats ha fet que incrementi d'interès pel desenvolupament de nous inhibidors amb una millor eficàcia terapèutica. Des de fa uns quants anys al nostre laboratori s'ha determinat l'activitat de nous compostos anticolinesteràsics analitzant-ne a més a més, el perfil farmacològic. Un dels grups més rellevants han estat les huprines. Aquests inhibidors, que son –tal com hem comentat anteriorment- híbrids tacrina-huperzina A, han mostrat una gran afinitat per l'AChE a més d'interaccionar amb els receptors muscarínics i nicotínics (Alcala et al., 2005; Roman et al., 2004). D'altra banda, s'ha demostrat que l'efecte terapèutic d'alguns anticolinesteràsics en el tractament de la MA va més enllà de la seva capacitat per inhibir l'enzim. Així, diversos estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que alguns anticolinesteràsics a més de produir efectes neuroprotectors poden actuar modificant els nivells de β A (Li et al., 2008; Matharu et al., 2009; Melo et al., 2009; Zhang et al., 2008). Per aquest motiu en aquest treball hem centrat la nostra atenció en les accions dels anticolinesteràsics, especialment les huprines -com també d'alguns derivats- sobre les accions no relacionades amb la seva activitat farmacològica principal i que tenen un gran interès en el desenvolupament de la MA: l'agregació amiloidogènica i la neuroprotecció.

Els compostos anticolinesteràsics avaluats han estat principalment, la huprina X, la huprina Y y la huprina Z. D'altra banda i a causa dels resultats obtinguts amb les huprines també shan analitzat alguns aspectes rellevants dels derivats heterodimèrics Hup8TCl i el Hup8TH que són el resultat de la dimerització de la huprina Y amb la tacrina.

L'AChE és un component important de les sinapsis colinèrgiques i colocalitza amb els dipòsits de β A en cervells afectats de MA. S'ha descrit que l'AChE a través del lloc aniònic perifèric, constitueix un important cofactor en la fibrillogènesi del pèptid β A, i és capaç d'interaccionar amb els agregats amiloidogènics formant complexos macromoleculares de gran estabilitat (Bartolini et al., 2003b; Campos et al., 1998; Inestrosa et al., 2005; Inestrosa et al., 1996). Sembla ser que aquesta interacció és específica ja que la relació final d'AChE/ β A en els agregats és aproximadament d'1:1000 (Alvarez et al., 1998). A més a més, s'ha demostrat que l'AChE indueix canvis conformationals en la proteïna i això facilita ja no tan sols l'increment de la mida dels agregats sinó també el canvi de conformació d'hèlix α a fulla plegada β que experimenta dita proteïna prèviament a la fibrillogènesi (Bartolini et al., 2003b ;Inestrosa et al., 2005).

Per aquest motiu resulta d'un interès rellevant poder trobar compostos que a través de la seva interacció amb l'AChE, especialment pel lloc perifèric, tinguin la capacitat d'inhibir l'activitat potenciadora de l'agregació d'aquest enzim. De fet, l'iodur de propidi, que és un inhibidor no competitiu pur de l'AChE, s'uneix únicament al lloc aniònic i en estudis *in vitro* s'ha demostrat que té una capacitat clara d'inhibir el procés d'agregació induït per l'AChE, reduint l'agregació de β A fins a un 82% a una concentració de 100 μ M (Inestrosa et al., 1996; Melchiorre et al., 1998; Taylor i Lappi, 1975). El donepezil (100 μ M) i el decametoni (100 μ M) que són inhibidors mixtos, redueixen l'agregació en un 22 i 25 % respectivament, i la tacrina (100 μ M) que també és un inhibidor de tipus mixt només la redueix en un 7%, atesa la seva major afinitat pel lloc catalític. En canvi l'edrofonil que és un inhibidor purament competitiu inhibeix en absolut el procés d'agregació de β A induït per l'AChE (Bartolini et al., 2003b).

Les proteïnes β A i PrP tenen la capacitat d'agregar i de fibrillar en els processos patològics de la MA i de les encefalopaties espongiformes, respectivament. En determinades condicions patològiques aquestes proteïnes poden adquirir una conformació rica en l'estructura secundària de fulla plegada β que condueix a la

insolubilització, l'acumulació, l'agregació i en última instància la fibril·logènesi (Soto, 2003).

Continuant amb el paral·lelisme entre βA i PrP ha estat demostrat que les plaques senils positives per βA presents en cervells de pacients que pateixen la MA contenen de manera habitual dipòsits de PrP (Hainfellner et al., 1998; Kellett and Hooper, 2009; Schwarze-Eicker et al., 2005). A més a més s'ha detectat βA en plaques senils d'individus amb malalties priòniques com ara la CJD i el GSS (Hainfellner et al., 1998; Miyazono et al., 1992; Yoshida et al., 2009). Les característiques comunes d'aquestes proteïnes i dels seus processos d'agregació ens van portar a hipotetitzar que l'ACHé potser també tindria la capacitat d'actuar com a cofactor de la fibril·logènesi de PrP.

Així doncs, si bé aquest efecte proagregant de l'ACHé s'ha descrit només per la proteïna βA , en el present estudi hem demostrat per primera vegada que l'ACHé indueix un increment significatiu de la mida dels agregats del pèptid PrP106-126, sota diferents condicions experimentals. D'altra banda, s'ha demostrat que aquest pèptid presenta característiques químicofísiques i biològiques similars a les descrites per la proteïna βA : adopta la conformació fulla plegada β en solució i agrega formant fibres amiloides que són resistents a la digestió per proteases (De et al., 1994; Forloni et al., 1993a; Salmona et al., 1999; Selvaggini et al., 1993; Soto i Estrada, 2008). Cal afegir, que el pèptid conté el nucli hidrofòbic responsable del canvi de PrP^C a PrP^{Sc} (Ragg et al., 1999; Soto et al., 2006).

L'anàlisi duta a terme al nostre laboratori mitjançant microscòpia de fluorescència mostra que la formació d'agregats de PrP106-126 curmarinada és un procés extremament ràpid fins a assolir el màxim de MMA transcorreguda una hora d'incubació (fig. 25). Aquestes dades són consistents amb les obtingudes anteriorment en experiments de sedimentació, que mostren que havent passat una hora d'incubació no és detectable la fracció soluble del pèptid en el sobrenedant (Salmona et al., 1999). La cinètica d'agregació de βA es desenvolupa de manera lenta i gradual i assoleix el seu màxim una vegada transcorregudes aproximadament vint hores des de l'inici de la incubació (Bartolini et al.,

2003b). Per tant, comparada amb la cinètica de β A, la cinètica de PrP106-126 és molt més ràpida. Aquesta diferència podria ser deguda al fet que PrP106-126 només té vint aminoàcids, que a més a més contenen la regió responsable del canvi a fulla plegada β . Així doncs, aquests dos factors podrien ser determinants en la velocitat del procés d'agregació d'aquest pèptid.

Els experiments de la cinètica d'agregació duts a terme amb AChE (2,5 μ M) van mostrar un significatiu i progressiu increment de la MMA, que va arribar al màxim entre 48 i 72 hores d'incubació (fig. 25). Cal destacar, que transcorreguda una hora des de l'inici de la incubació la MMA va ser molt més elevada en les mostres incubades en presència d'AChE que en les que es van incubar sense. Aquesta diferència entre les cinètiques d'agregació en presència o absència d'AChE desde les primeres hores també es va observar en el cas de β A (Bartolini et al., 2003b; Inestrosa et al., 1996). La cinètica d'agregació de PrP106-126 curmarinada va ser més pronunciada i constant en el temps, comparada amb els valors bibliogràfics de la cinètica de β A.

En les nostres condicions experimentals, quan es va incubar PrP106-126 en presència d'AChE es va observar un increment progressiu de la mida dels agregats en funció del temps d'incubació transcorregut. Els màxims d'agregació es van obtenir entre 48 i 72 hores d'incubació i la MMA era aproximadament dotze vegades més gran que la de les mostres controls. La cinètica d'increment de mida de dits agregats va tenir característiques similars a les descrites prèviament en el cas de la proteïna β A (Bartolini et al., 2003b). Tot i les similituds, cal destacar el fet que la cinètica d'agregació de β A en presència d'AChE succeeix de manera exponencial en les primeres hores i assoleix el màxim d'agregació transcorregudes vuit hores desde l'inici (Alvarez et al., 1997; Bartolini et al., 2003b). El perfil d'agregació de PrP106-126 en presència d'AChE també va mostrar una fase exponencial durant les primeres dues hores, però no va assolir el màxim fins que no en van passar quaranta-vuit hores, moment fins al qual l'agregació segueix un procés lent i gradual (fig. 25).

A més a més, aquest efecte proagregant de l'ACHÉ va resultar ser concentració dependent. A mesura que es va augmentar la concentració d'ACHÉ major va resultar la MMA, i va assolir en les mostres incubades amb AChE 2,5 μM una mida màxima dotze vegades superior a la de les mostres incubades en absència d'ACh (fig. 26). Aquest efecte és similar al prèviament descrit per la proteïna βA on en presència d'ACHÉ 2,3 μM s'assoleix onze vegades més agregació que a concentració zero d'ACHÉ (Alvarez et al., 1997 ;Bartolini et al., 2003b). El perfil d'increment de la mida dels agregats en concentracions creixents d'ACHÉ és molt similar en el cas dels dos pèptids, la qual cosa indica que l'ACHÉ té un efecte dosi-dependent sobre l'agregació de PrP106-126, comparable al que s'observa per al βA .

Malgrat que no hi ha homologies evidents ni en la seqüència ni en l'estructura de les diferents proteïnes involucrades en desordres relacionats amb alteracions conformacionals de les proteïnes, hi ha una gran quantitat d'evidències que ens indiquen que els agregats formats per proteïnes amb alteracions en el seu plegament tenen la mateixa estructura molecular final (Soto, 2003). Estudis que utilitzen fragments petits de βA han demostrat que la regió hidrofòbica interna entre els aminoàcids 17 i 21 és la més important pe als primers passos del procés de plegament erroni i d'agregació, i això indica que l'assemblatge de βA és parcialment guiat per interaccions hidrofòbiques (Armstrong et al., 2008; Hilbich et al., 1992). Estudis similars de la reacció de conversió de PrP han permès identificar la regió hidrofòbica 106-126 com la més rellevant per al procés d'agregació d'aquesta proteïna (Tagliavini et al., 1993). La troballa que seqüències hidrofòbiques són crítiques per l'agregació de PrP i de βA indica que aquest procés és conduït per l'exposició de residu hidrofòbics a la superfície de la proteïna mal plegada (Soto, 2003; Soto i Estrada, 2008).

El lloc perifèric de l'ACHÉ involucrat en la unió amb βA és una seqüència hidrofòbica exposada a la superfície de l'enzim. S'ha demostrat que un residu peptídic coincident amb els trenta-cinc aminoàcids del lloc perifèric és incorporat a les fibres de βA per interaccions hidrofòbiques (De Ferrari et al., 2001). βA té

una tendència elevada d'interaccionar amb regions hidrofòbiques i s'ha publicat que interaccions hidrofòbiques poden jugar un rol important en l'estabilització del complex de β A (Alvarez et al., 1997).

PrP106-126 mostra un polimorfisme conformacional en solució que suporta el rol que té aquest fragment en la transició estructural de la forma de PrP nativa a l'aberrant en resposta als canvis locals de les condicions ambientals (De et al., 1994). Simulacions de dinàmica molecular fetes en diferents ambients mostren que hi ha un increment de la presència d'estructures helicoïdals en solvents apolars, cosa que concorda amb les resultats obtinguts emprant la tècnica de *circular dichroism spectroscopy*.

La natura dels agregats generats per PrP106-126 en presència i absència d'AChE va ser examinada sota llum polaritzada i amb microscopi electrònic de transmissió. Amb la finalitat de verificar si aquests agregats corresponen amb una estructura amiloide es va utilitzar la tècnica del vermell Congo i es van analitzar els agregats mitjançant birefringència en un microscopi de llum polaritzada. Com es pot observar en la figura 28, els agregats macromoleculars de PrP106-126 i PrP106-126-AChE mostraren propietats tintorials i òptiques de birefringència amiloide in situ i.e. sota llum polaritzada després de la tinció amb vermell Congo. Les propietats birefringents dels agregats van ésser més evidents en presència d'AChE donat a la major mida dels agregats en presència d'aquest enzim.

L'estructura amiloide dels agregats també va ser confirmada per l'anàlisi amb microscòpia electrònica de transmissió. En absència i presència d'AChE, els agregats de PrP106-126 tenyits negativament mostraren que estan composts de fibres no ramificades entre 4-8 nm de gruix. No es van detectar diferències morfològiques destacables entre les fibres dels agregats de Prp106-126 sola o amb AChE (fig. 28). Si bé no hi ha diferències morfològiques, la quantitat de fibres presents en la mostra incubada en presència d'AChE és molt més elevada que en la mostra incubada en absència de l'enzim.

En conseqüència, aquestes dades ens confirmen que l'ACHÉ és capaç d'induir l'agregació amiloidogènica no només de la proteïna β A sinó també d'altres proteïnes de característiques amiloidogèniques similars. Cal destacar, a més a més, que en aquest estudi l'efecte de l'ACHÉ es reflecteix en un increment de mida dels agregats ja formats, ja que el procés d'agregació espontània del pèptid PrP106-126 fou pràcticament instantani per la qual cosa no es pot concloure, en aquestes condicions, que l'enzim afavoreixi el canvi de conformació d'hèlix α a fulla plegada β de dit pèptid, fet que s'ha descrit en la interacció entre l'ACHÉ i la proteïna β (Bartolini et al., 2003b).

En la interacció entre l'ACHÉ i la proteïna β A, que hi intervé de manera específica el lloc perifèric (lloc aniònic) de l'ACHÉ. Es tracta d'un motiu aniònic que es localitza a la superfície de l'enzim a prop de la gorja que conté el lloc catalític responsable de la hidròlisi de l'ACH (Weise et al., 1990). S'ha observat que compostos tals com l'iodur de propidi mostren una unió selectiva amb el lloc aniònic obstruint l'entrada de la gorja catalítica (Taylor and Radic, 1994). S'ha demostrat, tal com hem descrit prèviament, que aquest compost i altres de característiques similars, com el decametoni, inhibeixen l'agregació de la proteïna β A induïda per l'ACHÉ (Inestrosa et al., 1996; Inestrosa et al., 2005). Quan vam estudiar l'efecte proagregant de l'ACHÉ davant el pèptid PrP106-126 en presència d'iodur de propidi, es va poder observar que les mides dels agregats disminuïen de forma significativa fins a assolir valors propers al grup control. Els valors obtinguts són pràcticament idèntics als obtinguts als descrits prèviament en agregació de β A induïda per AChE en les mateixes condicions experimentals (Bartolini et al., 2003b). Així doncs, aquestes dades conjuntament amb el fet que l'iodur de propidi pot inhibir l'efecte de l'ACHÉ sobre l'agregació de PrP106-126 de manera concentració-dependent suggereix que l'ACHÉ indueix l'agregació de PrP106-126 a través del mateix lloc que l'agregació de β A.

Malgrat s'ha demostrat recentment que alguns heterodímers bastants en la tacrina poden inhibir l'agregació de β A induïda per AChE (Munoz-Ruiz et al., 2005), es sap que tan la tacrina com la huperzina A mostren una gran afinitat pel

lloc catalític de l'ACHé però no pel lloc perifèric (Ariel et al., 1998; Berman and Leonard, 1992). Les huprines han emergit recentment com una nova classe de potents inhibidors selectius de l'ACHé, que es van dissenyar a partir de l'hibridació de la tacrina i la huperzina A (Badia et al., 1998; Camps et al., 1999; Camps et al., 2000a).

Tot i que les huprines s'uneixen de manera preferent al lloc d'acilació de l'ACHé, les dades experimentals i els estudis de modelatge molecular han demostrat que la huprina X, atesa la seva geometria i el seu volum molecular, disminueix l'afinitat dels lligands pel lloc perifèric de l'enzim (Camps et al., 2000a). Les huprines incloses en el present estudi mostren inhibir clarament l'agregació de PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ induïda per AChE, amb un percentatge d'inhibició proper a l'obtingut amb iodur de propidi (87%), especialment les huprines X i Z (amb percentatges d'inhibició de 84 i 89% respectivament), però també la huprina Y, induint un efecte antiagregant del 63%.

Aquest resultat posen de manifest l'acció dual d'aquests compostos com a inhibidors del lloc catalític i del lloc perifèric al mateix temps. Tanmateix, la huperzina A i la tacrina, compostos que presenten una afinitat elevada per l'enzim (C₁₅₀ del rang nanomolar) no van modificar significativament l'acció proagregant de l'ACHé. Sembla, doncs, que l'afinitat de les huprines pel lloc catalític és completament independent de la del lloc perifèric, tal com s'havia descrit prèviament per altres inhibidors de l'ACHé (Taula 2) (Bartolini et al., 2003b).

Els resultats obtinguts amb PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ ens van conduir a analitzar el procés d'agregació també en seqüències més llargues de la PrP, tals com la PrP⁸²⁻¹⁴⁶; atès que aquest pèptid és el principal component de les fibres amiloides en la malaltia de GSS i el seu homòleg sintètic mostra propietats fisicoquímiques i activitat biològica apropiades per ser utilitzar en estudis *in vitro* (Gobbi et al., 2006; Tagliavini et al., 2001). Els resultats obtinguts en aquest estudi demostraren que l'acoblament de PrP⁸²⁻¹⁴⁶ i la formació de fibres és accelerada

en presència d'AChE, i el lloc perifèric de l'enzim està implicat en aquest efecte perquè l'iodur de propidi, un lligand selectiu del lloc perifèric, reverteix l'efecte amiloidogènic de l'AChE. Per tant PrP82-146 mostra un comportament similar al de la seqüència 106-126 en front a l'AChE.

Les encefalopaties espongiformes bovines (GSS, CJD, BSE) i la MA comparteixen nombrosos aspecte patològics, incloent-hi la degeneració neuronal, la gliosi i la deposició extracel·lular de pèptids amb conformació de fulla plegada- β . D'altra banda, la disminució dels nivells d'AChE en líquid cefaloraquidi (LCR) d'alguns pacients amb malaltia de CJD ha estat recentment demostrat, la qual cosa suggereix que l'alteració del sistema colinèrgic també es dona en malalties priòniques (Silveyra et al., 2006). En el present estudi, el peptid PrP82-146 cumarinat, va formar agregats ràpidament de manera que en els estudis cinètics transcorreguda una hora de l'inici de la incubació els valors de MMA van arribar de $749 \pm 45 \mu\text{m}^2$. No obstant això, va caldre incubar el pèptid com a mínim durant quaranta-vuit hores per tal d'obtenir els valors màxims de MMA ($1232 \pm 152 \mu\text{m}^2$). Malgrat que PrP82-146 i PrP106-126 contenen la mateixa seqüència d'aminoàcids hidrofòbics implicats en la formació de l'estructura secundària en fulla plegada- β , el perfil cinètic d'agregació d'ambdós pèptids difereix, ja que la PrP106-126 assoleix els valors màxims de MMA una hora després de l'inici de l'agregació (Pera et al., 2006). Anàlisis fetes amb pèptids sintètics curts homòlegs als fragments consecutius de PrP82-146 mostraren que la seqüència de residus 106-126 té la major propensió a adoptar estructures de fulla plegada- β estables i d'acoblar-se formant fibril·les amiloides que tenen una ultraestructura similar a l'observada en agregats de pacients de GSS (Gobbi et al., 2006; Salmona et al., 2003).

Com el cas de βA i PrP106-126 (Bartolini et al., 2003b; Inestrosa et al., 1996; Pera et al., 2006), el ritme d'agregació de PrP82-146 va ser més ràpid quan la incubació es va dur a terme en presència d'AChE. El pic de MMA en aquestes condicions experimentals va ser aproximadament set vegades més alt que l'obtingut en absència de l'enzim; a més a més, el valor màxim de MMA dels

agregats de PrP82-146 van ser substancialment més baixos que els obtinguts amb PrP106-126 (Pera et al., 2006).

A més a més, la velocitat de formació de fibres amiloides també ha demostrat ser dependent de la concentració de PrP82-146 (fig. 30). El màxim increment de la formació de fibres amiloides (mida màxima dels agregats) es va observar quan la proporció AChE:PrP82-146 estava incrementada a favor de l'AChE. Aquests resultats concorden amb l'efecte inductor de l'AChE en el procés de formació de fibres amiloides a partir de β A (1-49) observat per diferents autors (Bartolini et al., 2003b; Inestrosa et al., 1996; Inestrosa et al., 2005).

Consegüentment, aquests resultats i els prèviament descrits per la interacció proteica entre AChE- β A suggereixen que l'efecte accelerador de l'AChE sobre el procés d'agregació pot ser crucial, especialment en els primers estadis de desenvolupament de la malaltia quan els nivells de proteïnes amiloides són encara baixos comparats amb els nivells d'AChE. S'ha observat que utilitzant ratolins doble transgènics que sobreexpressen tant la proteïna precursora de l'amiloide humana (APP^{swe}) com l'AChE humana, l'inici d'aparició de les plaques es produeix de manera més ràpida que en les línies parentals (ratolins transgènics APP^{swe}; (Rees et al., 2003). Per tant, l'AChE podria actuar com un factor de nucleació que promou la formació de fibres amiloides en diferents malalties en què les proteïnes amiloides són implicades.

En el present estudi es va analitzar l'estructura dels agregats de PrP82-146 i de AChE-PrP82-146 utilitzant microscopi de llum polaritzada i electrònic de transmissió. Els acoblats macromoleculars dels tots dos tipus d'agregats mostraren propietats tintorials i òptiques de birefringència amiloide i.e., *in situ* després de la tinció amb vermell Congo. Les propietats de birefringència dels agregats van resultar ser més evidents en els agregats que contenien AChE, atès el considerable increment de la mida dels agregats.

L'estructura amiloide dels agregats també va ser confirmada mitjançant l'anàlisi amb microscopi electrònic de transmissió. En presència i en absència d'AChE, els agregats de PrP82-146 tenyits negativament mostraven que estan compostos per fibril·les no ramificades, sense diferències morfològiques entre les fibres dels agregats amb AChE o sense. La quantitat de fibres presents en el graelles del microscopi va ser més elevada en el cas de les mostres incubades en presència de l'enzim.

El paper del lloc perifèric de l'AChE accelerant l'acoblament de PrP82-146 va ser demostrat utilitzant l'iodur de propidi, un inhibidor específic del lloc perifèric de l'AChE (Szegletes et al., 1999). El fet de que l'iodur de propidi inhibeix l'agregació de β A induïda per l'AChE és un fet àmpliament demostrat (Alvarez et al., 1997; Bartolini et al., 2003b; Inestrosa et al., 1996). Quan el pèptid PrP82-146 cumarinat i l'AChE es van coincubar en presència d'iodur de propidi (100 μ M), es va obtenir una inhibició del 78 % de la MMA. Aquest valor era lleugerament inferior al prèviament descrit per l'agregació de β A i PrP106-126 induïda per AChE (Bartolini et al., 2003b; Pera et al., 2006). Per tant, el fet que el l'iodur de propidi inhibeixi l'efecte de l'AChE sobre el procés amiloidogènic de PrP82-146 suggereix que l'acció de l'AChE sobre aquest procés és duta a terme també a través del lloc perifèric de l'enzim. La inhibició del procés d'agregació de PrP82-146 induïda per l'AChE pel iodur de propidi també va ser confirmada mitjançant l'anàlisi amb microscopi de llum polaritzada i microscopi electrònic de transmissió. En ambdós casos es va veure una disminució de la mida dels agregats en presència de l'inhibidor específic del lloc perifèric.

La insolubilitat de les estructures amiloides i les dificultats per tal d'obtenir materials cristal·litzats limiten seriosament el nombre de metodologies (NMR i XRD= ressonància magnètica nuclear i difracció de raigs X) que poden donar una gran informació sobre les característiques estructurals i el procés d'agregació de les proteïnes. Per consegüent, la microscòpia de la força atòmica (MFA) ha esdevingut poderosa, com a eina d'anàlisi per fer estudis d'estructura, errors de plegament i agregació a la superfície de les proteïnes. L'autoacoblament

amiloidogènic dels agregats d'insulina (Jansen et al., 2005) i l'adsorció de l'albumina sèrica humana i de la tripsina pancreàtica porcina sobre la superfície de la mica han estat descrits mitjançant l'anàlisi amb el MFA (Quist et al., 1995). En el nostre estudi, les imatges de MFA confirmen el procés d'agregació de PrP82-146 a diferents temps. Les imatges control (de les mostres incubades en absència d'AChE) mostraren la formació de petits punts de proteïna (dímers i/o oligòmers) que exhibeixen una petita tendència a agregar a temps 0 hores. Un comportament similar s'ha descrit pels monòmers i el dímer d'insulina nativa dipositats sobre una superfície de mica (Jansen et al., 2005). Les imatges de MFA obtingudes transcorregudes vint-i-quatre i quaranta-vuit hores des de l'inci de la incubació mostraren un increment del grau d'amiloidogènesis espontània, com també es va observar en les anàlisis dutes a terme amb microscòpia electrònica, de llum polaritzada i de fluorescència. A més, es pot observar la formació de nous oligòmers a la monocapa proteica, la qual cosa suggereix la formació dels precursors de les fibres. No obstant això, la presència d'AChE indueix l'acceleració del procés d'agregació de PrP82-146, ja que al temps zero hores s'observa una estructura de rusc distorsionat i entrellaçat amb alçades superiors als 4 nm. Després de vint-i-quatre hores d'incubació, es poden detectar petites fibres a la superfície proteica, que poden assolir altures de fins a uns pocs μm . A més a més, aquestes fibres presenten trets de fibres amiloides madures, tals com les tendències tòrcer-se i doblegar-se (Khurana et al., 2003). La presència d'iodur de propidi concomitantment amb l'AChE inhibeix el procés d'agregació induït per l'enzim com en aquest mateix estudi es va observar en microscòpia de fluorescència, llum polaritzada i electrònica. Cal afegir que la monocapa proteica i la formació de fibres no es va observar en presència d'iodur de propidi.

Els resultats obtinguts sobre l'agregació dels pèptids priònics induïda per AChE i el paper que les huprines van mostrar que exercien com a inhibidors d'aquest procés ens van fer pensar que possiblement compostos duals amb capacitat per unir-se tant al lloc catalític com perifèric de l'AChE podrien mostrar un efecte inhibidor important. És per això que es van seleccionar dos heterodímers, especialment dissenyats per unir-se a aquests dos llocs de l'enzim i s'en va

analitzar l'activitat inhibidora sobre el procés d'agregació de PrP106-126 induït per AChE. Tots dos compostos van ser obtinguts per hibridació de la huprina Y i la tacrina, i són Hup8TCl i Hup8TH.

Per avaluar l'efecte de Hup8TCl i Hup8TH sobre el procés d'agregació de proteïnes amiloidogèniques es va dur a terme un estudi *in vitro* amb el pèptid priònic PrP106-126 juntament amb l'AChE de forma similar al fet amb les huprines. Tant Hup8TCl com Hup8TH disminueixen de manera clara el procés d'agregació de PrP106-126 induït per AChE. La CI_{50} de Hup8TCl és de $0,26342 \pm 0,05 \mu M$ i la de Hup8TH $CI_{50} = 0,06866 \pm 0,001 \mu M$; aquest últim compost és el que presenta una CI_{50} més baixa. Com hem comentat anteriorment, l'iodur de propidi s'uneix de manera selectiva al lloc perifèric de l'AChE, responsable de l'agregació de les proteïnes amiloidogèniques; la CI_{50} l'iodur de propidi respecte a la inhibició de l'agregació de PrP106-126 és de $1,27 \pm 0,1 \mu M$. Aquestes dades ens indiquen que els heterodímers Hup8TCl i Hup8TH, tenen una potència major a l'hora d'inhibir el procés d'agregació dels pèptids priònics induït per AChE.

Els percentatges d'inhibició de l'agregació de PrP106-126 induïda per l'AChE a una mateixa concentració de fàrmac ($100 \mu M$), són al voltant del 87% tant per Hup8TCl com per Hup8TH. Aquests percentatges d'inhibició són molt similars als valors del propidi (liligand selectiu del lloc perifèric de l'enzim) 87 % i les huprines X (84 %) i Z (89 %). En canvi, aquests percentatges d'inhibició són molt superiors als obtinguts amb la tacrina i la huperzina A, amb les quals no se supera el 16 %.

L'efecte proagregant l'AChE sobre el pèptid βA descrit per Inestrosa ha portat al desenvolupament de nous fàrmacs amb la capacitat d'interaccionar simultàniament tant amb el lloc actiu com amb el lloc perifèric (responsables de l'efecte proagregant) de l'enzim. Amb aquesta premissa es van dissenyar els heterodímers huprina-tacrina capaços, gràcies a la seva estructura química,

d'interaccionar tant amb el lloc actiu com amb el lloc perifèric de l'AChE (Muñoz-Torrero i Camps, 2008). Aquesta característica dels heterodímers explicaria la seva major afinitat per l'enzim, comparats amb compostos que només interaccionen amb el lloc perifèric (com és el cas del l'iodur de propidi), i també la seva major potència antiagregant.

A més de l'efecte antiagregant d'aquests heterodímers també es van caracteritzar altres aspectes del seu perfil farmacològic. En primer lloc vam determinar la capacitat inhibidòria de les colinesterases i en segon lloc la seva interacció amb receptors muscarínics.

Seguint amb aquesta línia d'estudi vam obtenir resultats que mostren clarament que tots dos heterodímers huprina-tacrina estudiats, Hup8TCl i Hup8TH, són dos potents inhibidors de l'AChE, que presenten unes CI_{50} de l'ordre de nanomolar sobre l'AChE humana, amb valors de $0,4 \pm 0,03$ nM per Hup8TCl i $0,33 \pm 0,01$ nM per Hup8TH, i que a més a més posseeixen una activitat superior a la mostrada per les huprines i la tacrina sota les mateixes condicions experimentals. D'altra banda, aquests heterodímers mostren IC_{50} superiors en el cas de la BChE, la qual cosa indica que tenen una major selectivitat per l'AChE. La raó entre les CI_{50} BChE/ CI_{50} AChE va ser d'aproximadament de 14 per Hup8TCl i de 20 per Hup8TH. Les huprines també van mostrar una major selectivitat per l'AChE que per la BChE, però en el cas de les huprines la CI_{50} per la BChE va ser molt superior a la presentada pels heterodímers. La tacrina va inhibir de manera més potent la BChE que l'AChE, la qual cosa coincideix amb els resultats publicats prèviament (Hunter et al., 1989; Jackisch et al., 2009).

Clàssicament s'ha considerat que la selectivitat vers l'AChE vs la BChE produïa una disminució en la presentació d'efectes colinèrgics perifèrics (Benzi i Moretti, 1998). No obstant això, nombroses evidències mostren que la BChE també juga un paper important en la hidròlisi de l'ACh, per la qual cosa la seva inhibició també podria aportar beneficis terapèutics. En el cervell sa, l'AChE suposa un 80

% del total de les ChE, mentre que la BChE representa tan sols un 20 % (Greig et al., 2001); es considera que aquesta última juga un paper poc important en la regulació dels nivells d'ACh. Tanmateix, això no és així en els cervells de pacients amb MA en els quals l'activitat de l'AChE pot disminuir fins a un 55-67 % dels valors normals i la BChE augmenta la seva activitat (Perry et al., 1978). Per tant, ambdós enzims sembla que estan implicats en la regulació dels nivells d'ACh, i poden considerar-se així dos objectius sobre els quals cal incidir per millorar el dèficit colinèrgic (Ballard et al., 2005; Giacobini, 2003b).

També s'ha suggerit que la BChE podria tenir un paper important en l'etiologia i la progressió de la MA més enllà de la simple regulació dels nivells de neurotransmissor colinèrgic (Giacobini, 2001; Greig et al., 2001; Mesulam et al., 2002). Així mateix s'ha caracteritzat un ratolí al qual li manca el gen que codifica per l'AChE i que ha resultat ser viable, malgrat que és més sensible a l'efecte dels inhibidors selectius de la BChE, la qual cosa demostra encara més clarament que aquest últim enzim és capaç d'hidrolitzar l'ACh i que és important en la neurotransmissió colinèrgica (Xie et al., 2000). A més, en aquests ratolins els nivells de BchE són considerablement superiors als normals, la qual cosa indica que aquest, i probablement també altres enzims, són capaços de compensar algunes de les funcions de l'AChE. Tenint en compte totes aquestes dades, més important que la selectivitat pel tipus de ChE, seria prioritari que un inhibidor centrés el seu efecte en el SNC, ja que l'activitat perifèrica podria comportar un augment dels símptomes colinèrgics indesitjats.

Com s'ha comentat abans, la BChE sembla que també té una funció sobre la progressió de la malaltia en afectar l'agregació de la proteïna β A en els primers estadis de la formació de plaques senils (Guillozet et al., 1997). Tant aquest enzim com l'AChE s'acumulen dins les plaques i es troben en els cabdells neurofibril·lars (Giacobini, 2003a; Mesulam i Geula, 1994). S'ha provat que la inhibició selectiva de la BChE en cultius de teixits produeix una disminució en els nivells de APP tant en l'àmbit intracel·lular com extracel·lular (Lahiri et al., 2000).

S'ha determinat que la inhibició de les ChE en el líquid cefaloraquídi produïda per la rivastigmina, inhibidor de tots dos enzims amb potència similar, es correlaciona clarament amb una millora de la funció cognitiva en pacients amb MA (Robert, 2002; Wynn and Cummings, 2004), la qual cosa proporciona proves experimentals sobre els beneficis terapèutics d'una inhibició simultània d'ambdós ChEs. Per tant, el fet que els inhibidors Hup8TCl i Hup8TH produeixin també una inhibició considerable sobre la BChE representa una característica de gran interès d'aquests compostos.

Malgrat que l'ús dels fàrmacs purament inhibidors de l'AChE ha estat el recurs més utilitzat per al tractament de la MA, la seva efectivitat s'ha vist limitada pel deteriorament del sistema colinèrgic a nivell presinàptic que dona lloc a una disminució de les reserves d'ACh (Dekosky, 2001; Dekosky i López, 1998; Lopez and Dekosky, 2003). D'altra banda, estudis postmortem de cervells de pacients afectats per la malaltia han assenyalat que no hi ha una alteració en la densitat de receptors muscarínics i la proteïna G a la qual s'associen en condicions normals (Ladner et al., 1995; Thathiah i De, 2009), malgrat això els receptors muscarínics M1 podrien ser una bona diana terapèutica de la MA. Tenint en compte aquestes dades, l'existència d'un compost que combinés ambdues propietats, la inhibició de les ChE cerebrals i agonisme muscarínic M1, podria suposar un gran avanç en aquest camp.

S'han descrit cinc tipus de receptors muscarínics, presents en el sistema nerviós central i perifèric (Bonner, 1989). Els receptors M1 es localitzen predominantment de forma postsinàptica en l'escorça cerebral, l'hipocamp i el sistema gastrointestinal. Els M2 es localitzen sobre tot a nivell presinàptic en les neurones colinèrgiques cerebrals i el teixit cardíac. El tipus M3 està en teixits glandulars, especialment en glàndules salivals. Els receptors M4 i M5 no estan ben caracteritzats i no s'han relacionat amb efectes adversos específics. Aquestes dades suggereixen que una activació selectiva dels receptors muscarínics M1 suposaria una millora eficaç dels dèficits cognitius que es presenten en la MA, i es

limitaria a la vegada al màxim la presentació d'efectes adversos associats a l'activació d'altres receptors muscarínics (Avery et al., 1997; Fisher et al., 2003).

Per aquest motiu vam estudiar la interacció d'aquests heterodímers sobre els receptors muscarínics de tipus M1. En els experiments en què es va estudiar el desplaçament de la fixació específica de [³H]-pirenzepina (liligand específic dels receptors M1) duta a terme pels heterodímers, es van obtenir corbes monofàsiques, amb valors de n_H propers a la unitat, la qual cosa va indicar que els compostos competien per un únic lloc de fixació. Ambdues substàncies mostraren una afinitat alta pels receptors muscarínics M1 i l'afinitat de Hup8TCI va ser lleugerament superior a la de Hup8TH, com pot veure's pels valors de K_i $2,1 \pm 0,24$ nM front $8,3 \pm 0,87$ nM malgrat aquesta diferència no és significativa. D'altra banda, els estudis de fixació de radiolligands als receptors muscarínics M2, que es van dur a terme amb [³H]-QNB, van evidenciar una afinitat menor dels heterodímers per aquest tipus de receptor, sent la K_i per Hup8TCI, 290 ± 13 nM, i en el cas de Hup8TH, de 200 ± 9 nM. Aquests resultats posen de manifest que tota dos heterodímers estudiats presenten una afinitat significativament superior pels receptors muscarínics M1 que no pas pels M2.

Hi ha estudis que demostren que la CI_{50} de la huperzina A pel desplaçament de la fixació de [³H]-QNB és superior a $500 \mu M$ (Tang et al., 1989) la qual cosa prova que aquest compost presenta una afinitat molt baixa pels receptors muscarínics, en comparació amb altres IACHÉ, incloent-hi la fisostigmina ($CI_{50} = 170 \mu M$). La tacrina, en canvi, interacciona amb receptors muscarínics en cervells humans i de rosegadors, malgrat que sense distinció entre els subtipus M1 i M2 (Flynn and Mash, 1989; Nilsson et al., 1987; Perry et al., 1988). Hunter et al 1989 van descriure que la tacrina s'uneix de manera no selectiva tant a receptors M1 ($K_i = 0,06 \mu M$) com als M2 ($K_i = 0,88 \mu M$). En un altre estudi s'ha posat de manifest que una CI_{50} de la tacrina pels receptors M1 igual a $0,7 \mu M$ (Snape et al., 1999). En qualsevol cas, de les diverses dades podem extreure que els heterodímers huperzina Y-tacrina emprats en aquest treball presenten una afinitat pels receptors muscarínics M1 superior a l'afinitat de la tacrina i, per descomptat,

de la huperzina A, compostos dels quals deriven les huprines. Presenten una afinitat superior que la huprina Y, que té una K_i de $0,25 \pm 0,09 \mu\text{M}$, i també que les altres huprines de les quals se'n va caracteritzar la interacció amb els receptors muscarínics, que serien la huprina X i Z amb K_i de $0,25 \pm 0,09 \mu\text{M}$ i $0,39 \pm 0,03 \mu\text{M}$ respectivament (Alcala et al., 2005; Roman et al., 2002a).

Diferents estudis *in vivo* i *in vitro* suggereixen que els agonistes muscarínics i, en particular, els que actuen preferentment sobre els receptors M1, produeixen una millora dels símptomes cognitius presents a la MA (Fisher, 2008b; Korczyn, 2000). La major afinitat pels receptors M1 dels heterodímers huprina-tacrina estudiats suposaria una via addicional per estimular el sistema colinèrgic, a més a més de la seva activitat com a IChE.

És important destacar que l'estimulació dels receptors M1 incrementa l'alliberament de l'APP soluble i, en conseqüència, disminueix la formació de proteïna βA (Eckols et al., 1995). L'existència d'una interacció entre el metabolisme anormal d'APP i la disfunció colinèrgica és cada vegada més obvia (Perry et al., 1996). L'APP és una proteïna transmembranal que és processada per una α -secretasa en el seu domini extracel·lular/intraluminal després de l'activació de receptors associats a proteïnes G acoblades a la seva vegada a la hidròlisi de fosfoinosítids. L'estimulació de receptors colinèrgics acoblats a aquests sistemes i a l'activació de la proteïna-quinasa C que produeix un increment de l'alliberament de formes solubles d'APP en diversos tipus de cèl·lules (Buxbaum et al., 1992; Buxbaum et al., 1990; Koch et al., 2005; Slack et al., 1997). L'activació mitjançant agonistes muscarínics de cèl·lules PC12 transfectades amb receptors muscarínics M1 va resultar en la secreció de fragments d'APP solubles, la qual cosa redueix a la seva vegada la producció de la proteïna βA (Danenberget al., 1995). Per tant, un empitjorament dels senyals de transducció lligats al sistema colinèrgic a causa de la proteïna βA podria reduir l'alliberament de formes solubles d'APP. Atès que l'APP humà protegeix les neurones davant de danys d'excitotoxicitat aguda i crònica *in vivo* (Cerpa et al., 2004; Masliah et al., 1997), a la vegada que disminueix els nivells de proteïna βA , l'activació dels

receptors muscarínics M1 podria jugar a més a més un paper en la neuroprotecció, la qual cosa representa un avantatge addicional dels heterodímers com agonistes d'aquests receptors.

Tornant a les huprines X, Y i Z de les quals hem parlat al llarg d'aquest treball, cal destacar que tenen nombroses característiques que les fan altament interessants: inhibeixen amb elevada potència l'activitat catalítica l'AChE (Alcala et al., 2003a), actuen com a agonistes dels receptors muscarínics i potenciadors dels receptors nicotínics (Alcala et al., 2005; Roman et al., 2004) i inhibeixen el procés d'agregació amiloidogènica (Pera et al., 2006). Les malalties neurodegeneratives, i en particular la malaltia d'Alzheimer, en el desenvolupament de les quals intervenen diferents factors, fan que actualment se cerquin compostos amb múltiples efectes beneficiosos, com és el cas de les huprines, i no amb la sola capacitat d'inhibir l'AChE.

Atesos els prometedors resultats obtinguts fins al moment amb les huprines i també al fet que la huperzina A, un dels compostos parentals del qual deriven les huprines, ha mostrat que té efectes neuroprotectors, es va considerar interessant analitzar la possible acció neuroprotectora de les huprines. Múltiples línies d'evidència suggereixen que els radicals lliures estan implicats en la citotoxicitat induïda per β A en els cervells de pacients amb MA. S'ha demostrat que el pèptid β A pot generar radicals lliures, indueix la producció intracel·lular d'espècies reactives d'oxigen (ROS), causa oxidació de proteïnes i peroxidació de lípids. Totes aquestes dades mostren que els cervells de pacients amb MA estan clarament sotmesos a un increment de l'estrès oxidatiu, el qual jugaria un paper molt important en la degeneració i la mort neuronal (Behl, 1999; Benzi i Moretti, 1995; Markesbery, 1997).

De fet, la demència es considera una conseqüència directa del dany neuronal i aquest dany està estrictament relacionat amb els processos oxidatius. També s'ha descrit que en l'envelliment no patològic hi ha un desequilibri entre els antioxidants i els prooxidants, la qual cosa comporta una acumulació de ROS

que incrementen el dany macromolecular (Ames et al., 1993), de manera que els desequilibris locals de la producció de ROS poden disparar o contribuir al desenvolupament d'aquestes malalties. De fet, quan parlem de l'etiologia i la fisiopatologia de la MA, necessàriament s'ha de parlar d'estrès oxidatiu: β A i l'estrès oxidatiu estan inevitablement lligats ja que els oxidants incrementen la producció de β A a les neurones (Misonou et al., 2000; Paola et al., 2000; Tamagno et al., 2005), l'estrès oxidatiu promou l'agregació de β A *in vitro* (Siegel et al., 2007), i β A fibril·lar indueix estrès oxidatiu *in vitro* i *in vivo* (Harkany et al., 2000).

El pèptid β A està associat amb espècies reactives de l'oxigen al bell mig de les plaques senils i el conjunt resulta altament tòxic per les a neurones. Les plaques incrementarien l'estrès oxidatiu, desencadenarien l'augment dels ROS (Guglielmotto et al., 2009; Markesbery, 1997; Markesbery i Carney, 1999; Reddy et al., 2009; Sultana et al., 2009), provocarien la disfunció cel·lular. Aquestes disfuncions que estarien relacionades amb la neurotoxicitat de β A i que condueixen a la neurodegeneració característica de la MA implicarien tant necrosi com apoptosi (Kitamura et al., 1999; Mattson, 2000; Pearson et al., 1985) La necrosi és causada per un dany cel·lular catastròfic que porta a l'imflam passiu de la cèl·lula, un dany dels orgànuls citoplasmàtics, i un ràpid col·lapse de l'homeòstasi interna. Eventualment pot comportar la lisi de la membrana, i l'alliberament del contingut cel·lular al medi extracel·lular, el qual provoca inflamació (Kerr et al., 1972; Schwartz et al., 1993). Mentre que la necrosi és un procés passiu, l'apoptosi és un procés actiu caracteritzat per l'encongiment cel·lular, la condensació de la cromatina i la formació de cossos apoptòtics (Kerr et al., 1972) (Kihara, 1992). Nosaltres ens hem centrat en la necrosi basant-nos en les dades d'alguns autors que posen de manifest la major importància de la necrosi davant de l'apoptosi en el desenvolupament de la MA (Zhu et al., 2006).

Tal com s'ha descrit a la introducció, una de les accions importants dels IChE i de gran interès com a agents terapèutics davant de malalties neurodegeneratives,

és la neuroprotecció. Un dels primers IChE que va mostrar efectes neuroprotectors va ser la huperzina A (Tang et al., 2005; Wang et al., 2006; Wang and Tang, 2005). Aquest fàrmac protegeix davant de la neurotoxicitat induïda per glutamat, peròxid d'hidrogen i β A25-35 (Zhang and Tang, 2000). Estudis *in vivo* amb rates tractades amb huperzina A han demostrat que a més dels efectes sobre el sistema colinèrgic aquest fàrmac té efectes beneficiosos sobre el sistema de destoxicació de radicals lliures i el metabolisme energètic (Zhang i Tang, 2000). Posteriorment també es va demostrar que tan el donepezil, com la galantamina i la tacrina mostren efectes neuroprotectors davant l'efecte neurotòxic induït per la proteïna β A (Svensson i Nordberg, 1998; Zhang et al., 2002; Zhou et al., 2001). Si bé aquests efectes neuroprotectors sembla que són independents de la seva interacció amb l'ACHÉ, perquè a que es produeixen a concentracions molt més elevades que la IC₅₀ per l'ACHÉ (Takada et al., 2003), si que s'ha demostrat que podria estar relacionat amb els receptors nicotínics (Svensson i Nordberg, 1998; Takada et al., 2003). En estudis previs fets al nostre laboratori es va demostrar que la (\pm)-huprina X té un efecte potenciador sobre el receptor nicotínic similar al descrit per la galantamina (Roman et al., 2004).

Així doncs, com que l'acció neuroprotectora dels IChE podria estar relacionada amb l'esmentat receptor i com que els compostos parentals de les huprines (huperzina A i tacrina) mostren efectes neuroprotectors es van fer una sèrie d'experiments amb la finalitat d'analitzar la possible acció neuroprotectora de les huprines. A més a més, estudis previs han demostrat que a (\pm)-huprina Y mostra un efecte protector davant el glutamat en cultiu de cèl·lules granulars i també davant de lesions estriatals induïdes per àcid 3-nitropropionínic (Canudas et al., 2003). Tanmateix, quan aquest mateix compost es va estudiar front a les lesions produïdes per la coquicina (fàrmac antimitòtic que atura la divisió cel·lular en metafase o anafase), la (\pm)-huprina Y no va mostrar cap efecte antiapoptòtic, utilitzant el mateix model experimental (Jorda et al., 2004).

En el present estudi es va analitzar l'habilitat d'un grup d'inhibidors de l'ACHÉ (les huprines X, Y i Z) per protegir cèl·lules davant d'estímuls oxidants. Amb

aquest propòsit es van utilitzar cèl·lules PC12 derivades de la medul·la adrenal de feocromocitoma de rata. Quan aquestes cèl·lules creixen en un medi ric en sèrum, es divideixen i actuen com a precursors de les cèl·lules cromafins de la medul·la o de neurones simpàtiques. A més a més en presència de NGF, aquestes cèl·lules naïf adquireixen gradualment característiques fenotípiques de neurones simpàtiques. Així doncs, constitueixen un bon model de cèl·lules neuronals (Sasaki et al., 2001).

Per consegüent, es va estudiar l'efecte de les huprines X, Y i Z davant de la lesió induïda per H_2O_2 en cèl·lules PC12, tant diferenciades amb NGF com sense diferenciar. L'estudi es va iniciar en cèl·lules PC12 no diferenciades, on la presència dels fàrmacs va induir efectes neuroprotectors quan aquests es van preincubar durant 24 o 48 hores abans de l'addició del H_2O_2 . Quan els fàrmacs es van incubar de forma concomitant amb H_2O_2 no es va observar cap efecte neuroprotector (dades no presentades). Aquestes dades posen de manifest la importància del temps de preincubació per tal que aquests compostos puguin exercir els seus efectes neuroprotectors. La importància del temps per observar efectes neuroprotectors en tractaments amb IChE és un fet demostrat la literatura científica. En estudis fets amb diferents IChE (donepezil, galantamina i tacrina) en neurones corticals davant l'agressió causada pel glutamat, es va observar que l'efecte protector d'aquests IChE era més pronunciat com més llarg fos el temps de incubació, i no es va observar cap efecte neuroprotector quan els IChE eren afegits al medi de manera concomitant amb el glutamat (Takada et al., 2003; Takada-Takatori et al., 2006).

Cal destacar que els efectes neuroprotectors de les huprines s'observen de manera més pronunciada quan incrementem els temps de preincubació fins a 48 hores. En aquest cas s'observen percentatges de protecció significatius fins i tot a la concentració més baixa ($0,01 \mu M$), en les tres huprines estudiades. Malgrat que en totes les huprines s'observen majors percentatges de protecció amb preincubacions de 48 hores, l'efecte més destacat es dona amb la huprina X, on passem d'aproximadament d'un 50 % de protecció a un 70 %.

Els estudis de la viabilitat cel·lular també es van dur a terme amb cèl·lules PC12 diferenciades amb NGF tal com hem comentat abans. Les cèl·lules diferenciades presenten característiques neuronals, per la qual cosa és possible que el perfil neuroprotector de les huprines sigui diferent en aquestes cèl·lules. En les cèl·lules diferenciades es van fer estudis només de les concentracions d'1 i 0,1 μM amb un període de preincubació de 48 hores abans d'afegir el H_2O_2 , ja que aquestes són les condicions en les quals les huprines van mostrar un efecte neuroprotector més rellevant en cèl·lules indiferenciades (70-51 %). Totes les huprines, a totes les dues concentracions estudiades, van exercir un efecte neuroprotector en aquest tipus cel·lular i els percentatges de neuroprotecció obtinguts són similars als de les cèl·lules indiferenciades.

Els percentatges de protecció en cèl·lules diferenciades tractades amb les tres huprines, oscil·len entre el 56 i el 44%. Per tant, que són similars als obtinguts amb les cèl·lules indiferenciades són lleugerament inferiors encara que les diferències no són significatives. Aquestes diferències en els resultats es podrien explicar com a conseqüència de les diferències dels dos tipus cel·lulars. Com hem comentat anteriorment en el procés de diferenciació es produeixen canvis que fan que passem de cèl·lules naïf a cèl·lules amb característiques de neurones simpàtiques. Aquests canvis podrien fer que les cèl·lules responguessin de manera diferent a un estímul agressiu com és el cas de l' H_2O_2 ; de fet, s'ha descrit una major sensibilitat de les cèl·lules PC12 diferenciades dels agents oxidants, entre els quals l' H_2O_2 , que explicarien aquesta menor recuperació de la viabilitat en cèl·lules diferenciades comparades amb PC12 indiferenciades (Sasaki et al., 2001).

En estudis realitzats prèviament en el nostre grup es va descriure que les huprines són agonistes dels receptors muscarínics M1 i dels receptors nicotínics (Alcala et al., 2005; Roman et al., 2002a; Roman et al., 2004). Aquestes dades ens van portar a pensar que fos possible que l'efecte agonista de les huprines sobre aquests receptors pogués desencadenar un efecte neuroprotector afegit a l'efecte potenciador del sistema colinèrgic.

La pèrdua de nAChRs està associada amb un gran nombre de malalties tals com la MA, la malaltia de Parkinson, la demència amb cossos de Lewy, l'esquizofrènia, l'autisme i els desordres de pèrdua d'atenció o hiperactivitat (Bourin et al., 2003; Court JA et al., 2000; Forgacs and Bodis-Wollner, 2004; Nordberg, 2001; Perry et al., 1990; Pimlott et al., 2004). Els nAChRs presinàptics poden modular l'alliberació de dopamina, noradrenalina, serotonina, ACh, àcid aminobutíric (GABA) i glutamat. Aquests sistemes de neurotransmissors juguen un paper molt important tant en funcions cognitives com no cognitives. Per tant els nAChRs serien una bona diana per a nous tractaments de malalties neurodegeneratives (Shimohama, 2009). Els estudis fets pel grup de Shimohama (Shimohama, 2009; Shimohama and Kihara, 2001) han permès hipotetitzar la implicació dels nAChRs en la cascada de neuroprotecció. Aclareixen que la cascada PI3K-Akt contribueix en els efectes neuroprotectors de la nicotina, i que la família de Bcl-2 és activada *downstream* de la cascada PI3K-Akt i funciona com un factor de mort. Es creu que l'activació de PI3K-Akt promou la supervivència cel·lular, i que l'*up*-regulació de Bcl-2 es un dels principals components d'aquest mecanisme de supervivència cel·lular. L'estimulació dels nAChRs transdueix aquestes senyals de supervivència de manera addicional al seu paper en la neurotransmissió.

Els receptors muscarínics també tenen un paper determinant en el desenvolupament de la MA; de fet, estan relacionats amb tres aspectes clau de la malaltia: el pèptid β A, la hiperfosforilació de tau i la pèrdua de funció colinèrgica que porta a les alteracions cognitives (Fisher et al., 2003). En el procés de la malaltia es produeix una reducció de receptors muscarínics, però cal destacar que els receptors muscarínics postsinàptics del subtipus M1 del neocòrtex estan preservats en pacients amb MA, mentre que els del subtipus M2 estan reduïts en nombre (Avery et al., 1997). Per tant, els agonistes dels receptors muscarínics dels subtipus M1, podrien ser una bona diana terapèutica. Hi ha estudis que posen de manifest la potencialitat del tractament amb agonistes muscarínics, que donen evidències de que l'activació d'aquests receptors comporta: l'activació de l'alfa-

secretasa i afavoreix el processament no amiloidogènic d'APP, la inhibició de la gamma-secretasa i disminueix així el processament amiloidogènic d'APP i a la reducció de la mort cel·lular provocada per β A i estrès oxidatiu (Fisher et al., 2003). Les dades prèvies obtingudes al nostre laboratori que mostren que la huprina X actua com un agonista dels receptors M1 (Roman et al., 2002a), i les dades bibliogràfiques que posen de manifest l'efecte protector dels agonistes muscarínics davant l'estrès oxidatiu (Fisher et al., 2003; Fisher, 2008b) ens van portar a pensar en la possible implicació dels receptors muscarínics en l'efecte neuroprotector de les huprines.

Amb l'objectiu de determinar si aquests receptors estaven implicats en el procés neuroprotector activat per les huprines, es van utilitzar els antagonistes selectius dels receptors nicotínics i muscarínics, la mecamilamina i l'atropina respectivament. En analitzar el paper d'aquests receptors en les cèl·lules indiferenciades no vam observar cap modificació de l'acció neuroprotectora de les huprines, cosa que ens va indicar que ni els receptors nicotínics ni els muscarínics influencien l'acció protectora d'aquests anticolinesteràsics. En canvi en les cèl·lules diferenciades es va observar una marcada disminució de la protecció significativa fins a valors molt similars als controls. Així, en presència de mecamilamina s'observà una disminució de la protecció entre el 2,3 %, al 7 % i al 17 % per les huprines Y, X i Z, respectivament. Cal destacar que s'ha demostrat que la població de receptors nicotínics és major en cèl·lules PC12 diferenciades, ja que el NGF incrementa la transcripció de les subunitats α 5, α 7 i β 4 del nAChR (Nakamura et al., 2001).

La major reducció de l'acció protectora de les huprines observada en presència de l'antagonista nicotínic estaria en consonància amb els resultats obtinguts en altres grups, que destaquen el potencial efecte dels receptors nicotínics en el desenvolupament de la malaltia davant l'efecte dels receptors muscarínics (Takada et al., 2003; Takada-Takatori et al., 2006). També s'ha mostrat que els efectes neuroprotectors del donepezil i la galantamina davant el glutamat poden ser revertits per antagonistes dels α 4- i α 4 nAChR i per determinats inhibidors de

quinases de la via de IP3K (Takada-Takatori et al., 2006). Aquesta complexa via, implica l'activació i la inhibició de nombroses proteïnes, i el resultat final pot desencadenar efectes tan variats com la proliferació cel·lular, l'apoptosi, la síntesi proteica o la transcripció. Bcl-2 i Bcl-xl són dos factors antiapoptòtics que formen part d'aquesta via i actuen al mitocondri.

També la presència de l'antagonista muscarínic atropina, en cèl·lules diferenciades amb NGF, va modificar la capacitat neuroprotectora de les huprines, si bé de manera parcial. Així doncs, en presència de les huprines i l'atropina de forma concomitant la protecció que van mostrar les huprines davant l'H₂O₂ va oscil·lar entre un 16 % i un 32 %.

Les nostres dades indiquen que la neuroprotecció induïda per les huprines estaria relacionada de manera important amb els nAChRs i com hem comentat anteriorment, l'activació d'aquests receptors pot activar la via PI3K-Akt. Sembla que aquesta mateixa via podria *up*-regular la expressió de la Cu/Zn-SOD a través de l'activació del NF-κβ (Rojo et al., 2004).

Els ROS es formen com bioproductes de la respiració i del metabolisme oxidatiu i la seva acumulació pot portar a la peroxidació de lípids, l'oxidació de proteïnes i a danys en el DNA (Gotz et al., 1994; Xiao et al., 2000b). Les cèl·lules estan equipades amb múltiples antioxidants com la glutatió peroxidasa, la catalasa i la superòxid dismutasa, juntament amb antioxidants no enzimàtics com el α-tocoferol, l'ascorbat, el glutatió i la cisteïna (Xiao et al., 2000b). Donada la importància de la SOD com a enzim detoxificador dels ROS, i a la relació de l'activació dels receptors nicotínics amb l'increment de la seva expressió, el pas següent del nostre estudi va ser analitzar la possible implicació de la SOD en el procés neuroprotector induït per les huprines.

En les cèl·lules no diferenciades es va observar una activació clara de la superòxid dismutasa a les concentracions d'1 i 0,1 μM amb un període de preincubació de quaranta-vuit hores, per les tres huprines estudiades. En el cas de l'huprina Z,

s'observa una activació significativa de la SOD fins i tot a la concentració de 0,01 μM . Les huprines també van induir un increment de l'activitat de la SOD en les mateixes condicions experimentals en cèl·lules diferenciades. En aquest segon cas l'augment de l'activitat és lleugerament menor a l'observat en cèl·lules no diferenciades (fig. 40).

Aquesta diferència aproximada del 30 % en l'activació de la SOD en cèl·lules indiferenciades i diferenciades podria tenir la seva base en l'efecte regulador dels enzims oxidatius exercit pel NGF en el cervell (Podratz and Windebank, 2005). El NGF ha mostrat ser un agent preventiu de la mort cel·lular mitjançant la *up* regulació d'enzims antioxidants, com és el cas de la SOD. La supervivència cel·lular davant l' H_2O_2 es veu incrementada en cèl·lules PC12 tractades amb NGF gràcies la *up*-regulació de la catalasa, la SOD i la glutatió peroxidasa (Jackson et al 1994; Pecha'n 1991). Els nivells de GSH estan incrementats en cèl·lules PC12 i SHSY5Y tractades amb NGF (Pan and Perez-Polo, 1993). El NGF també juga un paper molt important en la regulació dels enzims antioxidants en el cervell. En rates velles, el NGF restaura els nivells disminuïts de catalasa, SOD i GPx (Nistico et al., 1992). Altres autors proposen que els efectes de l'huperzina A (compost parental del qual deriven les huprines) en la neuroprotecció són molt similars als efectes del NGF (Cao et al., 2007; Tang et al., 2005). Passades quaranta-vuit hores d'incubació de cèl·lules PC12 amb huperzina A, comencen a créixer neurites, incrementa l'expressió d'ACHÉ, de NGF i la seva secreció; tots aquests efectes són efectes molt similars als observats en presència de NGF, però no tant potents en el cas de huperzina A.

Si el NGF per si sol provoca una *up*-regulació de la SOD, és comprensible que observem una menor activació d'aquest enzim que en cèl·lules indiferenciades. L'enzim ja estarà hiperactivat en presència de NGF amb la qual cosa els efectes que pugui arribar a produir el fàrmac seran menors que en cèl·lules que tenen un nivell d'activació basal.

Com que la mecamilamina va mostrar la capacitat d'inhibir en un elevat percentatge l'efecte neuroprotector de les hurpines en les cèl·lules diferenciades, es va avaluar si aquest antagonista era capaç de bloquejar l'activació de la SOD en aquestes cèl·lules. Les dades obtingudes no mostren reducció de l'activació de l'enzim en presència de mecamilamina. Seria possible que la regulació duta a terme pel NGF pugui emmascarar l'efecte dels nicotínics en aquesta activació. Cal destacar que el NGF per si sol indueix la via de la PI3K, que condueix a l'activació de la SOD (Shimoke et al., 2005). Per tant, tindria molt interès poder estudiar l'efecte d'aquests anticolinesteràsics en cultius primaris de neurones colinèrgiques per poder determinar la implicació dels receptors nicotínics en l'activació de la SOD observada en neurones colinèrgiques sense que el NGF afecti els resultats.



BEETHOVEN. Gustav Klimt

CONCLUSIONS

1. Hem demostrat per primer cop que l'ACHÉ indueix l'agregació del pèptid prionic PrP106-126, amb un mecanisme molt similar al descrit per al pèptid β A. Cal destacar que les anàlisis fetes amb llum polaritzada i microscòpia electrònica han confirmat la natura amiloide dels ensamblatges de pèptid. La inhibició d'aquest procés d'agregació amb iodur de propidi indica la implicació del lloc aniònic perifèric de l'ACHÉ, la qual cosa suggereix que l'efecte proagregant d'aquest enzim pot jugar un paper més general en la formació de fibres amiloides i no només amb la formació de fibres de β A.

2. Pel que fa a la seqüència de PrP82-146 hem demostrat que l'ACHÉ també és capaç de promoure la seva agregació a través del lloc perifèric de l'enzim. Els estudis cinètics, amb microscopis de llum polaritzada i microscopi electrònic, i sobretot els estudis amb microscòpia de força atòmica, mostren que l'ACHÉ actua com un factor de nucleació incrementant no només el nombre de nous oligòmers, sinó també la formació de fibres amiloides.

3. Els fàrmacs anticolinesteràsics Huprina X, Y i Z es comporten com inhibidors del lloc perifèric de l'ACHÉ amb percentatges d'inhibició de l'agregació induïda per l'enzim semblants als descrits pel iodur de propidi a una concentració de 100 μ M.

4. Els fàrmacs heterodímers amb acció dual sobre l'ACHÉ, Hup8TCI i Hup8TH, mostren una afinitat superior pel lloc perifèric de l'ACHÉ que el iodur de propidi com es desprén de les seves CI50 respectives. A més aquests compostos presenten una inhibició del lloc actiu de l'enzim de tipus nanomolar i també mostren una elevada afinitat pels receptors M1.

5. Pel que fa als estudis de neuroprotecció les huprines X, Y i Z, mostren un efecte protector clar en cèl·lules PC12, diferenciades amb NGF i sense diferenciar, enfront a l'agressió causada pel peròxid d'hidrogen. Mostren un augment clar de

la viabilitat cel·lular en presència d'aquest agent oxidant, que podria venir, en part, mitjançat per l'increment de l'activitat de l'enzim superòxid dismutasa. Part d'aquest efecte neuroprotector també vindria potenciat per l'activació de receptors nicotínics i muscarínics.

6. Les dades presentades en aquesta Tesi, juntament amb altres dades obtingudes al nostre laboratori, suggereixen que les huprines són fàrmacs potencials pel tractament de la malaltia d'Alzheimer, però també podrien jugar un paper important en altres malalties que cursen amb processos neurodegeneratius, com es desprén dels estudis de neuroprotecció.



SERPS D'AIGUA. Gustav Klimt

BIBLIOGRAFIA

- Abid,K., and Soto,C. (2006). The intriguing prion disorders. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 2342-2351.
- Adibhatla,R.M., and Hatcher,J.F. (2008). Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell. Biochem.* 49, 241-268.
- Aguado,F., Badia,A., Baños,J.E., Bosch,F., Bozzo,C., Camps,P., Contreras,L., Dierssen,M., Escolano,C., Görbig,D., Muñoz-Torrero,D., Pujol,M., Simon,M., Vázquez,M., and Vivas,N.M. (1994). Synthesis and evaluation of tacrine related compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 29, 205-221.
- Akaike,A. (2006). Preclinical evidence of neuroprotection by cholinesterase inhibitors. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 20, 58-11.
- Akasofu,S., Kimura,M., Kosasa,T., Ogura,H., and Sawada,K. (2006). Protective effect of donepezil in primary-cultured rat cortical neurons exposed to N-methyl-d-aspartate (NMDA) toxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 530, 215-222.
- Alcala,M.M., Maderuelo,A., Vivas,N.M., Camps,P., Munoz-Torrero,D., Clos,M.V., and Badia,A. (2005). Effects of (+/-)-huprine Y and (+/-)-huprine Z, two new anticholinesterasic drugs, on muscarinic receptors. *Neurosci. Lett.* 379, 106-109.
- Alcala,M.M., Vivas,N.M., Hospital,S., Camps,P., Munoz-Torrero,D., and Badia,A. (2003). Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids. *Neuropharmacology* 44, 749-755.
- Alvarez,A., Alarcon,R., Opazo,C., Campos,E.O., Munoz,F.J., Calderon,F.H., Dajas,F., Gentry,M.K., Doctor,B.P., De Mello,F.G., and Inestrosa,N.C. (1998). Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J. Neurosci.* 18, 3213-3223.
- Alvarez,A., Opazo,C., Alarcon,R., Garrido,J., and Inestrosa,N.C. (1997). Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* 272, 348-361.
- Ames,B.N., Shigenaga,M.K., and Hagen,T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7915-7922.
- Apetri,A.C., Surewicz,K., and Surewicz,W.K. (2004). The effect of disease-associated mutations on the folding pathway of human prion protein. *J. Biol. Chem.* 279, 18008-18014.
- Apetri,A.C., and Surewicz,W.K. (2002). Kinetic intermediate in the folding of human prion protein. *J. Biol. Chem.* 277, 44589-44592.
- Arenas, and Gou (1998). Donepezil. *Circ. Farm* 56, 24-26.

- Arendt, T., Bruckner, M.K., Lange, M., and Bigl, V. (1992). Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development--a study of molecular forms. *Neurochem. Int.* 21, 381-396.
- Ariel, N., Ordentlich, A., Barak, D., Bino, T., Velan, B., and Shafferman, A. (1998). The 'aromatic patch' of three proximal residues in the human acetylcholinesterase active centre allows for versatile interaction modes with inhibitors. *Biochem. J.* 335 (Pt 1), 95-102.
- Armstrong, R.A., Cairns, N.J., and Lantos, P.L. (2001). Spatial pattern of prion protein deposits in patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology.* 21, 19-24.
- Armstrong, R.A., Lantos, P.L., and Cairns, N.J. (2008). What determines the molecular composition of abnormal protein aggregates in neurodegenerative disease? *Neuropathology.* 28, 351-365.
- Avery, E.E., Baker, L.D., and Asthana, S. (1997). Potential role of muscarinic agonists in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 11, 450-459.
- Badia, A., Banos, J.E., Camps, P., Contreras, J., Gorbis, D.M., Munoz-Torrero, D., Simon, M., and Vivas, N.M. (1998). Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 427-440.
- Ballard, C.G., Greig, N.H., Guillozet-Bongaarts, A.L., Enz, A., and Darvesh, S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr. Alzheimer Res* 2, 307-318.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., 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., and 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.
- Barnham, K.J., Haeflner, F., Ciccotosto, G.D., Curtain, C.C., Tew, D., Mavros, C., Beyreuther, K., Carrington, D., Masters, C.L., Cherny, R.A., Cappai, R., and Bush, A.I. (2004). Tyrosine gated electron transfer is key to the toxic mechanism of Alzheimer's disease beta-amyloid. *FASEB J.* 18, 1427-1429.
- Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., and Andrisano, V. (2003). beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* 65, 407-416.
- Bartolomeo, A.C., Morris, H., Buccafusco, J.J., Kille, N., Rosenzweig-Lipson, S., Husbands, M.G., Sabb, A.L., Bou-Gharbia, M., Moyer, J.A., and Boast, C.A. (2000). The preclinical pharmacological profile of WAY-132983, a potent M1 preferring agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 584-596.

Basler,K., Oesch,B., Scott,M., Westaway,D., Walchli,M., Groth,D.F., McKinley,M.P., Prusiner,S.B., and Weissmann,C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428.

Behl,C. (2005). Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. *Subcell. Biochem.* 38, 65-78.

Behl,C. (1999). Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.* 57, 301-323.

Behl,C. (1997). Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res.* 290, 471-480.

Behl,C., Davis,J.B., Lesley,R., and Schubert,D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77, 817-827.

Belluti,F., Rampa,A., Piazzini,L., Bisi,A., Gobbi,S., Bartolini,M., Andrisano,V., Cavalli,A., Recanatini,M., and Valenti,P. (2005). Cholinesterase inhibitors: xanthostigmine derivatives blocking the acetylcholinesterase-induced beta-amyloid aggregation. *J. Med. Chem.* 48, 4444-4456.

Benzi,G., and Moretti,A. (1995). Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* 16, 661-674.

Benzi,G., and Moretti,A. (1998). Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.* 346, 1-13.

Berman,H.A., and Leonard,K. (1992). Interaction of tetrahydroaminoacridine with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* 41, 412-418.

Bharadwaj,P.R., Dubey,A.K., Masters,C.L., Martins,R.N., and Macreadie,I.G. (2008). Abeta aggregation and possible implications in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Cell Mol. Med.*

Birdsall,N.J., and Nathanson,N.M. (2001). Muscarinic receptors: it's a knockout. *Trends in Pharm Sci* 22, 215-219.

Bliss,T.V., and Collingridge,G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

Bodick,N.C., Offen,W.W., Shannon,H.E., Satterwhite,J., Lucas,R., van,L.R., and Paul,S.M. (1997). The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 11 Suppl 4, S16-S22.

Bonner,T.I. (1989). The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.* 12, 148-151.

Bores, G.M., Huger, F.P., Petko, W., Mutlib, A.E., Camacho, F., Rush, D.K., Selk, D.E., Wolf, V., Kosley, R.W., Jr., Davis, L., and Vargas, H.M. (1996). Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 728-738.

Bourin, M., Ripoll, N., and Dailly, E. (2003). Nicotinic receptors and Alzheimer's disease. *Curr. Med. Res Opin.* 19, 169-177.

Boyd-Kimball, D., Sultana, R., Mohammad-Abdul, H., and Butterfield, D.A. (2004). Rodent Abeta(1-42) exhibits oxidative stress properties similar to those of human Abeta(1-42): Implications for proposed mechanisms of toxicity. *J. Alzheimers. Dis.* 6, 515-525.

Bredesen, D.E., Rao, R.V., and Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature* 443, 796-802.

Brown, A.W., and Brierley, J.B. (1972). Anoxic-ischaemic cell change in rat brain light microscopic and fine-structural observations. *J. Neurol. Sci.* 16, 59-84.

Broytman, O., and Malter, J.S. (2004). Anti-Abeta: The good, the bad, and the unforeseen. *J. Neurosci. Res* 75, 301-306.

Buckingham, S.D., Jones, A.K., Brown, L.A., and Sattelle, D.B. (2009). Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol. Rev.* 61, 39-61.

Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J.M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J.J., Ironside, J.W., Jellinger, K., and . (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol.* 5, 459-466.

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.

Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.

Bullock, R., and Dengiz, A. (2005). Cognitive performance in patients with Alzheimer's disease receiving cholinesterase inhibitors for up to 5 years. *Int. J. Clin. Pract.* 59, 817-822.

Burstein, D.E., and Greene, L.A. (1978). Evidence for RNA synthesis-dependent and -independent pathways in stimulation of neurite outgrowth by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 75, 6059-6063.

Butterfield,D.A., and Bush,A.I. (2004). Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide. *Neurobiol. Aging* 25, 563-568.

Buxbaum,J.D., Gandy,S.E., Cicchetti,P., Ehrlich,M.E., Czernik,A.J., Fracasso,R.P., Ramabhadran,T.V., Unterbeck,A.J., and Greengard,P. (1990). Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 87, 6003-6006.

Buxbaum,J.D., Oishi,M., Chen,H.I., Pinkas-Kramarski,R., Jaffe,E.A., Gandy,S.E., and Greengard,P. (1992). Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 89, 10075-10078.

Caccamo,A., Fisher,A., and LaFerla,F.M. (2009). M1 agonists as a potential disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res* 6, 112-117.

Calderon,F.H., von,B.R., De,F.G., Luza,S., Aldunate,R., and Inestrosa,N.C. (1998). Toxic effects of acetylcholinesterase on neuronal and glial-like cells in vitro. *Mol. Psychiatry* 3, 247-255.

Campion,D., and Brice,A. (1998). Familias y genes. *Mundo científico* 186, 60-62.

Campos,E.O., Alvarez,A., and Inestrosa,N.C. (1998). Brain acetylcholinesterase promotes amyloid-beta-peptide aggregation but does not hydrolyze amyloid precursor protein peptides. *Neurochem. Res.* 23, 135-140.

Camps,P., Cusack,B., Mallender,W.D., El Achab,R.E., Morral,J., Munoz-Torrero,D., and Rosenberry,T.L. (2000a). Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* 57, 409-417.

Camps,P., El,A.R., Gorbis,D.M., Morral,J., Munoz-Torrero,D., Badia,A., Eladi,B.J., Vivas,N.M., Barril,X., Orozco,M., and Luque,F.J. (1999). Synthesis, in vitro pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 42, 3227-3242.

Camps,P., El,A.R., Morral,J., Munoz-Torrero,D., Badia,A., Banos,J.E., Vivas,N.M., Barril,X., Orozco,M., and Luque,F.J. (2000b). New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 43, 4657-4666.

Camps,P., Formosa,X., Munoz-Torrero,D., Petriguet,J., Badia,A., and Clos,M.V. (2005). Synthesis and pharmacological evaluation of huprine-tacrine heterodimers: subnanomolar dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* 48, 1701-1704.

- Canudas,A.M., Pubill,D., Sureda,F.X., Verdaguer,E., Camps,P., Munoz-Torrero,D., Jimenez,A., Camins,A., and Pallas,M. (2003). Neuroprotective effects of (+/-)-huprine Y on in vitro and in vivo models of excitotoxicity damage. *Exp. Neurol.* 180, 123-130.
- Cao,Y., Liu,J.W., Yu,Y.J., Zheng,P.Y., Zhang,X.D., Li,T., and Guo,M.C. (2007). Synergistic protective effect of picoside II and NGF on PC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂. *Pharmacol. Rep.* 59, 573-579.
- Capsoni,S., Giannotta,S., and Cattaneo,A. (2002). Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 99, 12432-12437.
- Carlier,P.R., Han,Y.F., Chow,E.S., Li,C.P., Wang,H., Lieu,T.X., Wong,H.S., and Pang,Y.P. (1999). Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 351-357.
- Caughey,B., and Raymond,G.J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266, 18217-18223.
- Cerpa,W.F., Barria,M.I., Chacon,M.A., Suazo,M., Gonzalez,M., Opazo,C., Bush,A.I., and Inestrosa,N.C. (2004). The N-terminal copper-binding domain of the amyloid precursor protein protects against Cu²⁺ neurotoxicity in vivo. *FASEB J.* 18, 1701-1703.
- Chae,H.Z., Kang,S.W., and Rhee,S.G. (1999). Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.* 300, 219-226.
- 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., and Oldstone,M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308, 1435-1439.
- Cheung,N.S., Pascoe,C.J., Giardina,S.F., John,C.A., and Beart,P.M. (1998). Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology* 37, 1419-1429.
- Cobb,N.J., and Surewicz,W.K. (2009). Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* 48, 2574-2585.
- Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 793-819.
- Cole,K.K., and Perez-Polo,J.R. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition prevents both apoptotic-like delayed neuronal death and necrosis after H₂O₂ injury. *J. Neurochem.* 82, 19-29.

- Cole, S.L., and Vassar, R. (2008). The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J. Biol. Chem.* 283, 29621-29625.
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 519-550.
- Collingridge, G.L. (1985). Long term potentiation in the hippocampus: mechanism and initiation and modulation by neurotransmitters. *Trends in Pharm Sci* 10, 407-411.
- Corey-Bloom, J. (2002). The ABC of Alzheimer's disease: cognitive changes and their management in Alzheimer's disease and related dementias. *Int. Psychogeriatr.* 14 Suppl 1, 51-75.
- Costa, P.R., Kocisko, D.A., Sun, B.Q., Lansbury, P.T., and Griffin, R.G. (1997). Determination of peptide amide configuration in a model amyloid fibril by solid-state NMR. *Journal of the American Chemical Society* 119, 10487-10493.
- Court JA, Martin-Ruiz, C., Graham, A., and Perry, E. (2000). Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J. Chem. Neuroanat.* 20, 281-298.
- Crawford, F., Suo, Z., Fang, C., Sawar, A., Su, G., Arendash, G., and Mullan, M. (1997). The vasoactivity of A beta peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826, 35-46.
- Cuajungco, M.P., Goldstein, L.E., Nunomura, A., Smith, M.A., Lim, J.T., Atwood, C.S., Huang, X., Farrag, Y.W., Perry, G., and Bush, A.I. (2000). Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc. *J. Biol. Chem.* 275, 19439-19442.
- Cummings, J.L. (1995). Dementia: the failing brain. *Lancet* 345, 1481-1484.
- Dajas-Bailador, F.A., Heimala, K., and Wonnacott, S. (2003). The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine is transduced into cellular responses in neurons: Ca²⁺ signals and neurotransmitter release. *Mol. Pharmacol.* 64, 1217-1226.
- Danenberg, H.D., Haring, R., Heldman, E., Gurwitz, D., Ben-Nathan, D., Pittel, Z., Zuckerman, A., and Fisher, A. (1995). Dehydroepiandrosterone augments M1-muscarinic receptor-stimulated amyloid precursor protein secretion in desensitized PC12M1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774, 300-303.
- Dani, J.A. (2001). Nicotinic receptor activity alters synaptic plasticity. *ScientificWorldJournal.* 1, 393-395.
- Dani, J.A., De, B.M., Liang, Y., Peterson, J., Zhang, L., Zhang, T., and Zhou, F.M. (2004). Potential applications of nicotinic ligands in the laboratory and clinic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 1837-1839.

Davies,L., Wolska,B., Hilbich,C., Multhaup,G., Martins,R., Simms,G., Beyreuther,K., and Masters,C.L. (1988). A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology* 38, 1688-1693.

De Ferrari,G.V., Canales,M.A., Shin,I., Weiner,L.M., Silman,I., and Inestrosa,N.C. (2001). A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* 40, 10447-10457.

De,G.L., Selvaggini,C., Ghibaudi,E., Diomede,L., Bugiani,O., Forloni,G., Tagliavini,F., and Salmona,M. (1994). Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 269, 7859-7862.

DeBoer,P., and Abercrombie,E.D. (1996). Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 775-783.

Dekosky,S.T. (2001). Epidemiology and pathophysiology of Alzheimer's disease. *Clin. Cornerstone.* 3, 15-26.

Dekosky,S.T., and López,O.L. (1998). Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.* 27, s16-s24.

Dobson,C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884-890.

Dobson,C.M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 3-16.

Dong,X.X., Wang,Y., and Qin,Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 379-387.

Donnelly-Roberts,D.L., Xue,I.C., Arneric,S.P., and Sullivan,J.P. (1996). In vitro neuroprotective properties of the novel cholinergic channel activator (ChCA), ABT-418. *Brain Res.* 719, 36-44.

Dreses-Werringloer,U., Lambert,J.C., Vingtdeux,V., Zhao,H., Vais,H., Siebert,A., Jain,A., Koppel,J., Rovelet-Lecrux,A., Hannequin,D., Pasquier,F., Galimberti,D., Scarpini,E., Mann,D., Lendon,C., Campion,D., Amouyel,P., Davies,P., Foskett,J.K., Campagne,F., and Marambaud,P. (2008). A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell* 133, 1149-1161.

Dubois,B., and Deweer,B. (1998). Los extravíos de la memoria. *Mundo científico* 186, 50-55.

- Dudal,S., Morissette,C., Lacombe,D., Tremblay,P., and Gervais,F. (2004). Differences in the amyloid-beta-induced inflammatory response in microglia from C57BL/6 and A/J strains of mice. *J. Neuroimmunol.* 153, 26-35.
- Eckols,K., Bymaster,F.P., Mitch,C.H., Shannon,H.E., Ward,J.S., and DeLapp,N.W. (1995). The muscarinic M1 agonist xanomeline increases soluble amyloid precursor protein release from Chinese hamster ovary-m1 cells. *Life Sci* 57, 1183-1190.
- Esch,F.S., Keim,P.S., Beattie,E.C., Blacher,R.W., Culwell,A.R., Oltersdorf,T., McClure,D., and Ward,P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- Fayuk,D., and Yakel,J.L. (2004). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor channel function by acetylcholinesterase inhibitors in rat hippocampal CA1 interneurons. *Mol. Pharmacol.* 66, 658-666.
- Fernando,M.S., and Ince,P.G. (2004). Vascular pathologies and cognition in a population-based cohort of elderly people. *J. Neurol. Sci.* 226, 13-17.
- Ferrer,I., Boada,R.M., Sanchez Guerra,M.L., Rey,M.J., and Costa-Jussa,F. (2004). Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 14, 11-20.
- Fisher,A. (2008b). M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease--the pivotal role of brain M1 receptors. *Neurodegener. Dis.* 5, 237-240.
- Fisher,A. (2008a). Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 5, 433-442.
- Fisher,A., Michaelson,D.M., Brandeis,R., Haring,R., Chapman,S., and Pittel,Z. (2000). M1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents in Alzheimer's disease. Rationale and perspectives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 315-320.
- Fisher,A., Pittel,Z., Haring,R., Bar-Ner,N., Kliger-Spatz,M., Natan,N., Egozi,I., Sonogo,H., Marcovitch,I., and Brandeis,R. (2003). M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J. Mol. Neurosci.* 20, 349-356.
- Flynn,D.D., and Mash,D.C. (1989). Multiple in vitro interactions with and differential in vivo regulation of muscarinic receptor subtypes by tetrahydroaminoacridine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250, 573-581.
- Forgacs,P.B., and Bodis-Wollner,I. (2004). Nicotinic receptors and cognition in Parkinson's Disease: the importance of neuronal synchrony. *J. Neural Transm.* 111, 1317-1331.

Forloni,G., Angeretti,N., Chiesa,R., Monzani,E., Salmona,M., Bugiani,O., and Tagliavini,F. (1993a). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543-546.

Forloni,G., Chiesa,R., Smioldo,S., Verga,L., Salmona,M., Tagliavini,F., and Angeretti,N. (1993b). Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport* 4, 523-526.

Frederikse,P.H., Garland,D., Zigler,J.S., Jr., and Piatigorsky,J. (1996). Oxidative stress increases production of beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid (Abeta) in mammalian lenses, and Abeta has toxic effects on lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 10169-10174.

Fujikawa,D.G., Ke,X., Trinidad,R.B., Shinmei,S.S., and Wu,A. (2002). Caspase-3 is not activated in seizure-induced neuronal necrosis with internucleosomal DNA cleavage. *J. Neurochem.* 83, 229-240.

Gasset,M., Baldwin,M.A., Lloyd,D.H., Gabriel,J.M., Holtzman,D.M., Cohen,F., Fletterick,R., and Prusiner,S.B. (1992). Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10940-10944.

Geerts,H., Finkel,L., Carr,R., and Spiros,A. (2002). Nicotinic receptor modulation: advantages for successful Alzheimer's disease therapy. *J. Neural Transm. Suppl* 203-216.

Geula,C., and Darvesh,S. (2004). Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc.)* 40, 711-721.

Giacobini,E. (1998). Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy. *J. Physiol Paris* 92, 283-287.

Giacobini,E. (2003b). Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res* 28, 515-522.

Giacobini,E. (2001). Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs Aging* 18, 891-898.

Giacobini,E. (2003a). Cholinergic function and Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18, 51-55.

Giacobini,E., and Becker,R. (2004). Second and third generation cholinesterase inhibitors: from preclinical studies to clinical efficacy in Alzheimer's disease, therapeutic strategies. In: Giacconini and Becker (Eds.) Birkhäuser, Boston. 155-171.

Glockshuber,R. (2001). Folding dynamics and energetics of recombinant prion proteins. *Adv. Protein Chem.* 57, 83-105.

Gobbi,M., Colombo,L., Morbin,M., Mazzoleni,G., Accardo,E., Vanoni,M., Del,F.E., Cantu,L., Kirschner,D.A., Manzoni,C., Beeg,M., Ceci,P., Ubezio,P., Forloni,G., Tagliavini,F., and Salmona,M. (2006). Gerstmann-Straussler-Scheinker disease amyloid protein polymerizes according to the "dock-and-lock" model. *J. Biol. Chem.* 281, 843-849.

Goldsbury,C.S., Wirtz,S., Muller,S.A., Sunderji,S., Wicki,P., Aebi,U., and Frey,P. (2000). Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors. *J. Struct. Biol.* 130, 217-231.

Goon,D., Saxena,M., Awasthi,Y.C., and Ross,D. (1993). Activity of mouse liver glutathione S-transferases toward trans,trans-muconaldehyde and trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119, 175-180.

Gotz,M.E., Kunig,G., Riederer,P., and Youdim,M.B. (1994). Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol. Ther.* 63, 37-122.

Greene,L.A., and Tischler,A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 73, 2424-2428.

Greig,N.H., Utsuki,T., Yu,Q., Zhu,X., Holloway,H.W., Perry,T., Lee,B., Ingram,D.K., and Lahiri,D.K. (2001). A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res Opin.* 17, 159-165.

Grossman,H. (2003). Does diabetes protect or provoke Alzheimer's disease? Insights into the pathobiology and future treatment of Alzheimer's disease. *CNS. Spectr.* 8, 815-823.

Gu,Z., Zhong,P., and Yan,Z. (2003). Activation of muscarinic receptors inhibits beta-amyloid peptide-induced signaling in cortical slices. *J. Biol. Chem.* 278, 17546-17556.

Guglielmotto,M., Tamagno,E., and Danni,O. (2009). Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. *ScientificWorldJournal.* 9, 781-791.

Guillozet,A.L., Smiley,J.F., Mash,D.C., and Mesulam,M.M. (1997). Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann. Neurol.* 42, 909-918.

Hainfellner,J.A., Wanschitz,J., Jellinger,K., Liberski,P.P., Gullotta,F., and Budka,H. (1998). Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 96, 116-122.

Hardy,J., and Selkoe,D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.

Harkany,T., Abraham,I., Konya,C., Nyakas,C., Zarandi,M., Penke,B., and Luiten,P.G. (2000). Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev. Neurosci.* 11, 329-382.

Harman,D. (1996). A hypothesis on the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 786, 152-168.

Harman,D. (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7124-7128.

Hartley,D.M., Walsh,D.M., Ye,C.P., Diehl,T., Vasquez,S., Vassilev,P.M., Teplow,D.B., and Selkoe,D.J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* 19, 8876-8884.

Hashimoto,M., Kazui,H., Matsumoto,K., Nakano,Y., Yasuda,M., and Mori,E. (2005). Does donepezil treatment slow the progression of hippocampal atrophy in patients with Alzheimer's disease? *Am. J. Psychiatry* 162, 676-682.

Helmuth,L. (2000). Alzheimer's congress. Further progress on a beta-amyloid vaccine. *Science* 289, 375.

Hilbich,C., Kisters-Woike,B., Reed,J., Masters,C.L., and Beyreuther,K. (1992). Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides. *J. Mol. Biol.* 228, 460-473.

Hirotsu,I., Hori,N., Katsuda,N., and Ishihara,T. (1989). Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res* 482, 194-197.

Hock,C., Maddalena,A., Raschig,A., Muller-Spahn,F., Eschweiler,G., Hager,K., Heuser,I., Hampel,H., Muller-Thomsen,T., Oertel,W., Wienrich,M., Signorell,A., Gonzalez-Agosti,C., and Nitsch,R.M. (2003). Treatment with the selective muscarinic m1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer's disease. *Amyloid.* 10, 1-6.

Hogg,R.C., and Bertrand,D. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors as drug targets. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* 3, 123-130.

Hooper,N.M., and Turner,A.J. (2002). The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer s disease. *Curr. Med. Chem.* 9, 1107-1119.

Hope,J., Morton,L.J., Farquhar,C.F., Multhaup,G., Beyreuther,K., and Kimberlin,R.H. (1986). The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* 5, 2591-2597.

- Hornung, J.P., Koppel, H., and Clarke, P.G. (1989). Endocytosis and autophagy in dying neurons: an ultrastructural study in chick embryos. *J. Comp Neurol.* 283, 425-437.
- Hou, S.T., and MacManus, J.P. (2002). Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int. Rev. Cytol.* 221, 93-148.
- Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J.D., Westaway, D., Ott, J., and Prusiner, S.B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 338, 342-345.
- Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1991). Molecular genetics and transgenic model of Gertsmann-Straussler-Scheinker disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 5, 155-162.
- Hu, M.K., Wu, L.J., Hsiao, G., and Yen, M.H. (2002). Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* 45, 2277-2282.
- Huang, X., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Cuajungco, M.P., Gray, D.N., Lim, J., Moir, R.D., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. (1999). The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38, 7609-7616.
- Hunter, A.J., Murray, T.K., Jones, J.A., Cross, A.J., and Green, A.R. (1989). The cholinergic pharmacology of tetrahydroaminoacridine in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 98, 79-86.
- Ibach, B., and Haen, E. (2004). Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des* 10, 231-251.
- Iliev, A.I., Traykov, V.B., Mantchev, G.T., Stoykov, I., Prodanov, D., Yakimova, K.S., and Krushkov, I.M. (2000). A post-ischaemic single administration of galanthamine, a cholinesterase inhibitor, improves learning ability in rats. *J. Pharm Pharmacol.* 52, 1151-1156.
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., and Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16, 881-891.
- Inestrosa, N.C., Sagal, J.P., and Colombres, M. (2005). Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. *Subcell. Biochem.* 38, 299-317.
- Isaac, M.G., Quinn, R., and Tabet, N. (2008). Vitamin E for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD002854.
- Jack, C.R., Jr., Petersen, R.C., Xu, Y., O'Brien, P.C., Smith, G.E., Ivnik, R.J., Tangalos, E.G., and Kokmen, E. (1998). Rate of medial temporal lobe atrophy in typical aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 51, 993-999.

Jackisch,R., Forster,S., Kammerer,M., Rothmaier,A.K., Ehret,A., Zentner,J., and Feuerstein,T.J. (2009). Inhibitory potency of choline esterase inhibitors on acetylcholine release and choline esterase activity in fresh specimens of human and rat neocortex. *J. Alzheimers. Dis.* 16, 635-647.

Jaeschke,H., and Lemasters,J.J. (2003). Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125, 1246-1257.

Jansen,R., Dzwolak,W., and Winter,R. (2005). Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophys. J.* 88, 1344-1353.

Jarrett,J.T., Berger,E.P., and Lansbury,P.T., Jr. (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 144-148.

Jorda,E.G., Verdaguer,E., Jimenez,A., Canudas,A.M., Rimbau,V., Camps,P., Munoz-Torrero,D., Camins,A., and Pallas,M. (2004). (+/-)-huprine Y, (-)-huperzine A and tacrine do not show neuroprotective properties in an apoptotic model of neuronal cytoskeletal alteration. *J. Alzheimers. Dis.* 6, 577-583.

Kawahara,M., Negishi-Kato,M., and Sadakane,Y. (2009). Calcium dyshomeostasis and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid protein. *Expert Rev. Neurother.* 9, 681-693.

Kellett,K.A., and Hooper,N.M. (2009). Prion protein and Alzheimer disease. *Prion.* 3.

Kerr,J.F., Wyllie,A.H., and Currie,A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Khurana,R., Ionescu-Zanetti,C., Pope,M., Li,J., Nielson,L., Ramirez-Alvarado,M., Regan,L., Fink,A.L., and Carter,S.A. (2003). A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys. J.* 85, 1135-1144.

Kihara,T.S.S.S.S.-H.R.B.W.K.-G.B.O.F.W.A. (1992). Programmed cell death and its protective role with particular reference to apoptosis. *Toxicology Letters.*

Kim,D., and Tsai,L.H. (2009). Bridging physiology and pathology in AD. *Cell* 137, 997-1000.

Kim,H.S., Park,C.H., Cha,S.H., Lee,J.H., Lee,S., Kim,Y., Rah,J.C., Jeong,S.J., and Suh,Y.H. (2000). Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J.* 14, 1508-1517.

Kim,S.H., Fountoulakis,M., Cairns,N., and Lubec,G. (2001). Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J. Neural Transm. Suppl* 223-235.

- Kimura,M., Akasofu,S., Ogura,H., and Sawada,K. (2005a). Protective effect of donepezil against Abeta(1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. *Brain Res* 1047, 72-84.
- Kimura,M., Komatsu,H., Ogura,H., and Sawada,K. (2005b). Comparison of donepezil and memantine for protective effect against amyloid-beta(1-42) toxicity in rat septal neurons. *Neurosci. Lett.* 391, 17-21.
- Kirkitadze,M.D., Condron,M.M., and Teplow,D.B. (2001). Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.* 312, 1103-1119.
- Kitamura,Y., Taniguchi,T., and Shimohama,S. (1999). Apoptotic cell death in neurons and glial cells: implications for Alzheimer's disease. *Jpn. J. Pharmacol.* 79, 1-5.
- Koch,H.J., Haas,S., and Jurgens,T. (2005). On the physiological relevance of muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 12, 2915-2921.
- Kocisko,D.A., Come,J.H., Priola,S.A., Chesebro,B., Raymond,G.J., Lansbury,P.T., and Caughey,B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-474.
- Korczyn,A.D. (2000). Muscarinic M(1) agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 9, 2259-2267.
- Koster,A., Penninx,B.W., Bosma,H., Kempen,G.I., Newman,A.B., Rubin,S.M., Satterfield,S., Atkinson,H.H., Ayonayon,H.N., Rosano,C., Yaffe,K., Harris,T.B., Rooks,R.N., van Eijk,J.T., and Kritchevsky,S.B. (2005). Socioeconomic differences in cognitive decline and the role of biomedical factors. *Ann. Epidemiol.* 15, 564-571.
- Krause,R.M., Buisson,B., Bertrand,S., Corringer,P.J., Galzi,J.L., Changeux,J.P., and Bertrand,D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* 53, 283-294.
- Krebs,M.R., Domike,K.R., and Donald,A.M. (2009). Protein aggregation: more than just fibrils. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 682-686.
- Krishnan,K.R., Charles,H.C., Doraiswamy,P.M., Mintzer,J., Weisler,R., Yu,X., Perdomo,C., Ieni,J.R., and Rogers,S. (2003). Randomized, placebo-controlled trial of the effects of donepezil on neuronal markers and hippocampal volumes in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 160, 2003-2011.
- Kwon,Y.E., Park,J.Y., No,K.T., Shin,J.H., Lee,S.K., Eun,J.S., Yang,J.H., Shin,T.Y., Kim,D.K., Chae,B.S., Leem,J.Y., and Kim,K.H. (2007). Synthesis, in vitro assay, and molecular modeling of new piperidine derivatives having dual inhibitory potency against acetylcholinesterase and Abeta1-42 aggregation for Alzheimer's disease therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6596-6607.

- Lachowicz,J.E., Duffy,R.A., Ruperto,V., Kozlowski,J., Zhou,G., Clader,J., Billard,W., Binch,H., III, Crosby,G., Cohen-Williams,M., Strader,C.D., and Coffin,V. (2001). Facilitation of acetylcholine release and improvement in cognition by a selective M2 muscarinic antagonist, SCH 72788. *Life Sci.* 68, 2585-2592.
- Ladner,C.J., Celesia,G.G., Magnuson,D.J., and Lee,J.M. (1995). Regional alterations in M1 muscarinic receptor-G protein coupling in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 783-789.
- Lahiri,D.K., Farlow,M.R., Hintz,N., Utsuki,T., and Greig,N.H. (2000). Cholinesterase inhibitors, beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptides in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl* 176, 60-67.
- Lai,M.K., Lai,O.F., Keene,J., Esiri,M.M., Francis,P.T., Hope,T., and Chen,C.P. (2001). Psychosis of Alzheimer's disease is associated with elevated muscarinic M2 binding in the cortex. *Neurology* 57, 805-811.
- Lazareno,S., Popham,A., and Birdsall,N.J. (2002). Towards a high-affinity allosteric enhancer at muscarinic M1 receptors. *J. Mol. Neurosci.* 19, 123-127.
- Lemere,C.A. (2009). Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Prog. Brain Res* 175, 83-93.
- Levin,E.D., and Rezvani,A.H. (2002). Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* 1, 423-431.
- Li,J., Wu,H.M., Zhou,R.L., Liu,G.J., and Dong,B.R. (2008). Huperzine A for Alzheimer's disease. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD005592.
- Liu,Q., and Zhao,B. (2004). Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br. J. Pharmacol.* 141, 746-754.
- Login,I.S. (1997). D2 dopamine receptor activation inhibits basal and forskolin-evoked acetylcholine release from dissociated striatal cholinergic interneurons. *Brain Res.* 749, 147-151.
- Lopez,O.L., and Dekosky,S.T. (2003). [Neuropathology of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment]. *Rev. Neurol.* 37, 155-163.
- Luque,F.A., and Jaffe,S.L. (2009). The molecular and cellular pathogenesis of dementia of the Alzheimer's type an overview. *Int. Rev. Neurobiol.* 84, 151-165.
- Maelicke,A., Samochocki,M., Jostock,R., Fehrenbacher,A., Ludwig,J., Albuquerque,E.X., and Zerlin,M. (2001). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 49, 279-288.

Mangialasche,F., Polidori,M.C., Monastero,R., Ercolani,S., Camarda,C., Cecchetti,R., and Mecocci,P. (2009). Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev.* 8, 285-305.

Mark,R.J., Lovell,M.A., Markesbery,W.R., Uchida,K., and Mattson,M.P. (1997). A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* 68, 255-264.

Markesbery,W.R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 134-147.

Markesbery,W.R., and Carney,J.M. (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9, 133-146.

Marsh,R.F., Sipe,J.C., Morse,S.S., and Hanson,R.P. (1976). Transmissible mink encephalopathy. Reduced spongiform degeneration in aged mink of the Chediak-Higashi genotype. *Lab Invest* 34, 381-386.

Martin-Ruiz,C.M., Court JA, Molnar,E., Lee,M., Gotti,C., Mamalaki,A., Tsouloufis,T., Tzartos,S., Ballard,C., Perry,R.H., and Perry,E.K. (1999). Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 73, 1635-1640.

Masliah,E., Westland,C.E., Rockenstein,E.M., Abraham,C.R., Mallory,M., Veinberg,I., Sheldon,E., and Mucke,L. (1997). Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries in vivo. *Neuroscience* 78, 135-146.

Matharu,B., Gibson,G., Parsons,R., Huckerby,T.N., Moore,S.A., Cooper,L.J., Millichamp,R., Allsop,D., and Austen,B. (2009). Galantamine inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity. *J. Neurol. Sci* 280, 49-58.

Mattson,M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 120-129.

Melchiorre,C., Andrisano,V., Bolognesi,M.L., Budriesi,R., Cavalli,A., Cavrini,V., Rosini,M., Tumiatti,V., and Recanatini,M. (1998). Acetylcholinesterase noncovalent inhibitors based on a polyamine backbone for potential use against Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 41, 4186-4189.

Melo,J.B., Sousa,C., Garcao,P., Oliveira,C.R., and Agostinho,P. (2009). Galantamine protects against oxidative stress induced by amyloid-beta peptide in cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 29, 455-464.

Mendelson,I., Kronman,C., Ariel,N., Shafferman,A., and Velan,B. (1998). Bovine acetylcholinesterase: cloning, expression and characterization. *Biochem. J.* 334 (Pt 1), 251-259.

Messer, W.S., Jr. (2002). Cholinergic agonists and the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 353-358.

Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., and Quinn, B. (2002). Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol. Dis.* 9, 88-93.

Mesulam, M.M., and Geula, C. (1994). Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann. Neurol.* 36, 722-727.

Meunier, J., Ieni, J., and Maurice, T. (2006a). Antiamnesic and neuroprotective effects of donepezil against learning impairments induced in mice by exposure to carbon monoxide gas. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 1307-1319.

Meunier, J., Ieni, J., and Maurice, T. (2006b). The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma₁ receptor. *Br. J. Pharmacol.* 149, 998-1012.

Meyer-Luehmann, M., Stalder, M., Herzig, M.C., Kaeser, S.A., Kohler, E., Pfeifer, M., Boncristiano, S., Mathews, P.M., Mercken, M., Abramowski, D., Staufenbiel, M., and Jucker, M. (2003). Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat. Neurosci.* 6, 370-377.

Minana, M.D., Montoliu, C., Llansola, M., Grisolia, S., and Felipo, V. (1998). Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology* 37, 847-857.

Minger, S.L., Esiri, M.M., McDonald, B., Keene, J., Carter, J., Hope, T., and Francis, P.T. (2000). Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology* 55, 1460-1467.

Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Munoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F., and Inestrosa, N.C. (2000). The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 62, 633-648.

Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., and Ihara, Y. (2000). Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A β) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 39, 6951-6959.

Miyazono, M., Kitamoto, T., Iwaki, T., and Tateishi, J. (1992). Colocalization of prion protein and beta protein in the same amyloid plaques in patients with Gerstmann-Straussler syndrome. *Acta Neuropathol.* 83, 333-339.

Modrego, P.J. (2006). The effect of drugs for Alzheimer disease assessed by means of neuroradiological techniques. *Curr. Med. Chem.* 13, 3417-3424.

Monsonogo,A., and Weiner,H.L. (2003). Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science* 302, 834-838.

Moreira,P.I., Duarte,A.I., Santos,M.S., Rego,A.C., and Oliveira,C.R. (2009). An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 16, 741-761.

Morgan,D., Diamond,D.M., Gottschall,P.E., Ugen,K.E., Dickey,C., Hardy,J., Duff,K., Jantzen,P., DiCarlo,G., Wilcock,D., Connor,K., Hatcher,J., Hope,C., Gordon,M., and Arendash,G.W. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982-985.

Mori,E., Hashimoto,M., Krishnan,K.R., and Doraiswamy,P.M. (2006). What constitutes clinical evidence for neuroprotection in Alzheimer disease: support for the cholinesterase inhibitors? *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 20, S19-S26.

Mori,E., Lee,K., Yasuda,M., Hashimoto,M., Kazui,H., Hirono,N., and Matsui,M. (2002). Accelerated hippocampal atrophy in Alzheimer's disease with apolipoprotein E epsilon4 allele. *Ann. Neurol.* 51, 209-214.

Mori,F., Lai,C.C., Fusi,F., and Giacobini,E. (1995). Cholinesterase inhibitors increase secretion of APPs in rat brain cortex. *Neuroreport* 6, 633-636.

Moroni,F., Meli,E., Peruginelli,F., Chiarugi,A., Cozzi,A., Picca,R., Romagnoli,P., Pellicciari,R., and Pellegrini-Giampietro,D.E. (2001). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors attenuate necrotic but not apoptotic neuronal death in experimental models of cerebral ischemia. *Cell Death. Differ.* 8, 921-932.

Munoz,F.J., and Inestrosa,N.C. (1999). Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of Abeta peptide and the AChE concentration present in the complexes. *FEBS Lett.* 450, 205-209.

Munoz,F.J., Sole,M., and Coma,M. (2005). The protective role of vitamin E in vascular amyloid beta-mediated damage. *Subcell. Biochem.* 38, 147-165.

Munoz-Ruiz,P., Rubio,L., Garcia-Palomero,E., Dorronsoro,I., del Monte-Millan,M., Valenzuela,R., Usan,P., de,A.C., Bartolini,M., Andrisano,V., Bidon-Chanal,A., Orozco,M., Luque,F.J., Medina,M., and Martinez,A. (2005). Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 48, 7223-7233.

Muñoz-Torrero,D., and Camps,P. (2008). Huprines for Alzheimer's disease drug development. *Expert Opin. Drug discov.* 3(1), 65-81.

Munoz-Torrero,D. (2008). Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 15, 2433-2455.

Munoz-Torrero,D., and Camps,P. (2006). Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Med. Chem.* 13, 399-422.

- Muramoto,T., Kitamoto,T., Koga,H., and Tateishi,J. (1992). The coexistence of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with dementia of long duration. *Acta Neuropathol.* 84, 686-689.
- Nakamura,S., Takahashi,T., Yamashita,H., and Kawakami,H. (2001). Nicotinic acetylcholine receptors and neurodegenerative disease. *Alcohol* 24, 79-81.
- Narahashi,T., Marszalec,W., Moriguchi,S., Yeh,J.Z., and Zhao,X. (2003). Unique mechanism of action of Alzheimer's drugs on brain nicotinic acetylcholine receptors and NMDA receptors. *Life Sci.* 74, 281-291.
- Nicholls,D.G., Budd,S.L., Castilho,R.F., and Ward,M.W. (1999). Glutamate excitotoxicity and neuronal energy metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893, 1-12.
- Nicoll,J.A., Wilkinson,D., Holmes,C., Steart,P., Markham,H., and Weller,R.O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat. Med.* 9, 448-452.
- Nilsson,L., Adem,A., Hardy,J., Winblad,B., and Nordberg,A. (1987). Do tetrahydroaminoacridine (THA) and physostigmine restore acetylcholine release in Alzheimer brains via nicotinic receptors? *J. Neural Transm.* 70, 357-368.
- Nistico,G., Ciriolo,M.R., Fiskin,K., Iannone,M., De,M.A., and Rotilio,G. (1992). NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rats. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 177-181.
- Nordberg,A. (2001). Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol. Psychiatry* 49, 200-210.
- Nordberg,A., Lilja,A., Lundqvist,H., Hartvig,P., Amberla,K., Viitanen,M., Warpman,U., Johansson,M., Hellstrom-Lindahl,E., Bjurling,P., and . (1992). Tacrine restores cholinergic nicotinic receptors and glucose metabolism in Alzheimer patients as visualized by positron emission tomography. *Neurobiol. Aging* 13, 747-758.
- Nunomura,A., Hofer,T., Moreira,P.I., Castellani,R.J., Smith,M.A., and Perry,G. (2009). RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 118, 151-166.
- O'Neill,M.J., Murray,T.K., Lakics,V., Visanji,N.P., and Duty,S. (2002). The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* 1, 399-411.
- Oesch,B., Westaway,D., Walchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., and . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.
- Pakaski,M., and Kalman,J. (2008). Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 53, 103-111.

Pan,K.M., Baldwin,M., Nguyen,J., Gasset,M., Serban,A., Groth,D., Mehlhorn,I., Huang,Z., Fletterick,R.J., Cohen,F.E., and . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10962-10966.

Pan,Z., and Perez-Polo,R. (1993). Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J. Neurochem.* 61, 1713-1721.

Pang,Y.P., Quiram,P., Jelacic,T., Hong,F., and Brimijoin,S. (1996). Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271, 23646-23649.

Paola,D., Domenicotti,C., Nitti,M., Vitali,A., Borghi,R., Cottalasso,D., Zaccheo,D., Odetti,P., Stocchi,P., Marinari,U.M., Tabaton,M., and Pronzato,M.A. (2000). Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid beta-protein production and selective activation of beta1 and beta11 PKCs in NT2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 642-646.

Paradis,E., Douillard,H., Koutroumanis,M., Goodyer,C., and LeBlanc,A. (1996). Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J. Neurosci.* 16, 7533-7539.

Pauly,J.R. (1999). Nicotinic cholinergic receptor deficits in Alzheimer's disease: where's the smoke? *J. Alzheimers. Dis.* 1, 221-230.

Pearson,R.C., Esiri,M.M., Hiorns,R.W., Wilcock,G.K., and Powell,T.P. (1985). Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 82, 4531-4534.

Pepeu,G., and Giovannini,M.G. (2009). Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr. Alzheimer Res* 6, 86-96.

Pera,M., Roman,S., Ratia,M., Camps,P., Munoz-Torrero,D., Colombo,L., Manzoni,C., Salmona,M., Badia,A., and Clos,M.V. (2006). Acetylcholinesterase triggers the aggregation of PrP 106-126. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 89-94.

Perry,E.K., Court JA, Lloyd,S., Johnson,M., Griffiths,M.H., Spurden,D., Piggott,M.A., Turner,J., and Perry,R.H. (1996). Beta-amyloidosis in normal aging and transmitter signaling in human temporal lobe. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 777, 388-392.

Perry,E.K., Kilford,L., Lees,A.J., Burn,D.J., and Perry,R.H. (2003). Increased Alzheimer pathology in Parkinson's disease related to antimuscarinic drugs. *Ann. Neurol.* 54, 235-238.

Perry,E.K., Smith,C.J., Court JA, Bonham,J.R., Rodway,M., and Atack,J.R. (1988). Interaction of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine (THA) with

human cortical nicotinic and muscarinic receptor binding in vitro. *Neurosci. Lett.* 91, 211-216.

Perry,E.K., Smith,C.J., Court JA, and Perry,R.H. (1990). Cholinergic nicotinic and muscarinic receptors in dementia of Alzheimer, Parkinson and Lewy body types. *J. Neural Transm. Park Dis. Dement. Sect. 2*, 149-158.

Perry,E.K., Tomlinson,B.E., Blessed,G., Bergmann,K., Gibson,P.H., and Perry,R.H. (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* 2, 1457-1459.

Pike,C.J., Walencewicz-Wasserman,A.J., Kosmoski,J., Cribbs,D.H., Glabe,C.G., and Cotman,C.W. (1995). Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem.* 64, 253-265.

Pimlott,S.L., Piggott,M., Owens,J., Grealley,E., Court JA, Jaros,E., Perry,R.H., Perry,E.K., and Wyper,D. (2004). Nicotinic acetylcholine receptor distribution in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease, and vascular dementia: in vitro binding study using 5-[(125)I]-a-85380. *Neuropsychopharmacology* 29, 108-116.

Podratz,J.L., and Windebank,A.J. (2005). NGF rescues DRG neurons in vitro from oxidative damage produced by hemodialyzers. *Neurotoxicology* 26, 343-350.

Portera-Cailliau,C., Price,D.L., and Martin,L.J. (1997a). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp Neurol.* 378, 70-87.

Portera-Cailliau,C., Price,D.L., and Martin,L.J. (1997b). Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J. Comp Neurol.* 378, 88-104.

Pratico,D. (2008). Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1147, 70-78.

Prusiner,S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13363-13383.

Prusiner,S.B., and Scott,M.R. (1997). Genetics of prions. *Annu. Rev. Genet.* 31, 139-175.

Prusiner,S.B., Scott,M.R., DeArmond,S.J., and Cohen,F.E. (1998). Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.

Qiu,Y., Wu,X.J., and Chen,H.Z. (2003). Simultaneous changes in secretory amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide release from rat hippocampus by activation of muscarinic receptors. *Neurosci. Lett.* 352, 41-44.

- Quist,A.P., Bergman,A.A., Reimann,C.T., Oscarsson,S.O., and Sundqvist,B.U. (1995). Imaging of single antigens, antibodies, and specific immunocomplex formation by scanning force microscopy. *Scanning Microsc.* 9, 395-400.
- Ragg,E., Tagliavini,F., Malesani,P., Monticelli,L., Bugiani,O., Forloni,G., and Salmona,M. (1999). Determination of solution conformations of PrP106-126, a neurotoxic fragment of prion protein, by ¹H NMR and restrained molecular dynamics. *Eur. J. Biochem.* 266, 1192-1201.
- Rang,H.P., Dale,M.M., Ritter,J.M., and Moore,P.K. (2003a). Cholinergic transmission. *Pharmacology Churchill Livingstone*, 136-160.
- Rang,H.P., Dale,M.M., Ritter,J.M., and Moore,P.K. (2003b). Neurodegenerative Disorders. *Pharmacology Churchill Livingstone*, 490-502.
- Rao,K.S. (2009). Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46, 9-15.
- Reddy,V.P., Zhu,X., Perry,G., and Smith,M.A. (2009). Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 16, 763-774.
- Rees,T., Hammond,P.I., Soreq,H., Younkin,S., and Brimijoin,S. (2003). Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* 24, 777-787.
- Riepe,M.W. (2005). Cholinergic treatment: what are the early neuropathological targets? *Eur. J. Neurol.* 12 Suppl 3, 3-9.
- Robert,P. (2002). Understanding and managing behavioural symptoms in Alzheimer's disease and related dementias: focus on rivastigmine. *Curr. Med. Res Opin.* 18, 156-171.
- Rodriguez-Franco,M.I., Fernandez-Bachiller,M.I., Perez,C., Hernandez-Ledesma,B., and Bartolome,B. (2006). Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J. Med. Chem.* 49, 459-462.
- Rojo,A.I., Salinas,M., Martin,D., Perona,R., and Cuadrado,A. (2004). Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J. Neurosci.* 24, 7324-7334.
- Roman,S., Badia,A., Camps,P., and Clos,M.V. (2004). Potentiation effects of (+/-)huprine X, a new acetylcholinesterase inhibitor, on nicotinic receptors in rat cortical synaptosomes. *Neuropharmacology* 46, 95-102.
- Roman,S., Vivas,N.M., Badia,A., and Clos,M.V. (2002). Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (+/-)huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neurosci. Lett.* 325, 103-106.

Ros,E., Aleu,J., Gomez,d.A., I, Munoz-Torrero,D., Camps,P., Badia,A., Marsal,J., and Solsona,C. (2001). The pharmacology of novel acetylcholinesterase inhibitors, (+/-)-huprines Y and X, on the Torpedo electric organ. *Eur. J. Pharmacol.* 421, 77-84.

Roses,A.D. (1997). Alzheimer's disease: the genetics of risk. *Hosp. Pract. (Minneap.)* 32, 51-63, 67.

Ruiz-Nuño,A., Pintado,A.J., and Novalbos,J.M. (1998). Donepezilo: una alternaiva terapéutica a la enfermedad de Alzheimer. *Farmacoterapia XV* 101-104.

Sabbagh,M.N., Farlow,M.R., Relkin,N., and Beach,T.G. (2006). Do cholinergic therapies have disease-modifying effects in Alzheimer's disease? *Alzheimers. Dement.* 2, 118-125.

Sakaguchi,S., Katamine,S., Nishida,N., Moriuchi,R., Shigematsu,K., Sugimoto,T., Nakatani,A., Kataoka,Y., Houtani,T., Shirabe,S., Okada,H., Hasegawa,S., Miyamoto,T., and Noda,T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-531.

Salmona,M., Malesani,P., De,G.L., Gorla,S., Bruschi,M., Molinari,A., Della,V.F., Pedrotti,B., Marrari,M.A., Awan,T., Bugiani,O., Forloni,G., and Tagliavini,F. (1999). Molecular determinants of the physicochemical properties of a critical prion protein region comprising residues 106-126. *Biochem. J.* 342 (Pt 1), 207-214.

Salmona,M., Morbin,M., Massignan,T., Colombo,L., Mazzoleni,G., Capobianco,R., Diomede,L., Thaler,F., Mollica,L., Musco,G., Kourie,J.J., Bugiani,O., Sharma,D., Inouye,H., Kirschner,D.A., Forloni,G., and Tagliavini,F. (2003). Structural properties of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease amyloid protein. *J. Biol. Chem.* 278, 48146-48153.

Salud (1999). Actualización del tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer. *Bol. Ter. Andal* 15, 13-15.

Samochocki,M., Hoffle,A., Fehrenbacher,A., Jostock,R., Ludwig,J., Christner,C., Radina,M., Zerlin,M., Ullmer,C., Pereira,E.F., Lubbert,H., Albuquerque,E.X., and Maelicke,A. (2003). Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 1024-1036.

Sasaki,N., Baba,N., and Matsuo,M. (2001). Cytotoxicity of reactive oxygen species and related agents toward undifferentiated and differentiated rat phenochromocytoma PC12 cells. *Biol. Pharm Bull.* 24, 515-519.

Schatzl,H.M., Da,C.M., Taylor,L., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 245, 362-374.

Schwab,B.L., Guerini,D., Didszun,C., Bano,D., Ferrando-May,E., Fava,E., Tam,J., Xu,D., Xanthoudakis,S., Nicholson,D.W., Carafoli,E., and Nicotera,P. (2002). Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis. *Cell Death. Differ.* 9, 818-831.

Schwartz,L.M., Smith,S.W., Jones,M.E., and Osborne,B.A. (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 90, 980-984.

Schwarze-Eicker,K., Keyvani,K., Gortz,N., Westaway,D., Sachser,N., and Paulus,W. (2005). Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiol. Aging* 26, 1177-1182.

Scott,M., Foster,D., Mirenda,C., Serban,D., Coufal,F., Walchli,M., Torchia,M., Groth,D., Carlson,G., DeArmond,S.J., Westaway,D., and Prusiner,S.B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847-857.

Selvaggini,C., De,G.L., Cantu,L., Ghibaudi,E., Diomede,L., Passerini,F., Forloni,G., Bugiani,O., Tagliavini,F., and Salmona,M. (1993). Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 194, 1380-1386.

Shepherd,C., McCann,H., and Halliday,G.M. (2009). Variations in the neuropathology of familial Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118, 37-52.

Shimohama,S. (2009). Nicotinic receptor-mediated neuroprotection in neurodegenerative disease models. *Biol. Pharm Bull.* 32, 332-336.

Shimohama,S., and Kihara,T. (2001). Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity. *Biol. Psychiatry* 49, 233-239.

Shimoke,K., Kishi,S., Utsumi,T., Shimamura,Y., Sasaya,H., Oikawa,T., Uesato,S., and Ikeuchi,T. (2005). NGF-induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway prevents thapsigargin-triggered ER stress-mediated apoptosis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 389, 124-128.

Siegel,S.J., Bieschke,J., Powers,E.T., and Kelly,J.W. (2007). The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry* 46, 1503-1510.

Siek,G.C., Katz,L.S., Fishman,E.B., Korosi,T.S., and Marquis,J.K. (1990). Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biol. Psychiatry* 27, 573-580.

Sies,H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69, 965-968.

- Silveyra, M.X., Garcia-Ayllon, M.S., Calero, M., and Saez-Valero, J. (2006). Altered glycosylation of acetylcholinesterase in the Creutzfeldt-Jakob cerebrospinal fluid. *J. Mol. Neurosci.* 30, 65-66.
- Slack, B.E., Breu, J., Muchnicki, L., and Wurtman, R.J. (1997). Rapid stimulation of amyloid precursor protein release by epidermal growth factor: role of protein kinase C. *Biochem. J.* 327 (Pt 1), 245-249.
- Snape, M.F., Misra, A., Murray, T.K., De Souza, R.J., Williams, J.L., Cross, A.J., and Green, A.R. (1999). A comparative study in rats of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. *Neuropharmacology* 38, 181-193.
- Sobrado, M., Roda, J.M., Lopez, M.G., Egea, J., and Garcia, A.G. (2004). Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 365, 132-136.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49-60.
- Soto, C., Estrada, L., and Castilla, J. (2006). Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem. Sci.* 31, 150-155.
- Soto, C., and Estrada, L.D. (2008). Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch. Neurol.* 65, 184-189.
- Spires-Jones, T.L., Meyer-Luehmann, M., Osetek, J.D., Jones, P.B., Stern, E.A., Bacskai, B.J., and Hyman, B.T. (2007). Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am. J. Pathol.* 171, 1304-1311.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.
- Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death. Differ.* 5, 997-1000.
- Sultana, R., Perluigi, M., and Butterfield, D.A. (2009). Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Aβ in pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 118, 131-150.
- Supattapone, S., Nguyen, H.O., Muramoto, T., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Scott, M. (2000). Affinity-tagged miniprion derivatives spontaneously adopt protease-resistant conformations. *J. Virol.* 74, 11928-11934.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., and Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253, 872-879.

- Svensson,A.L. (2000). Tacrine interacts with different sites on nicotinic receptor subtypes in SH-SY5Y neuroblastoma and M10 cells. *Behav. Brain Res* 113, 193-197.
- Svensson,A.L., and Nordberg,A. (1996). Tacrine interacts with an allosteric activator site on alpha 4 beta 2 nAChRs in M10 cells. *Neuroreport* 7, 2201-2205.
- Svensson,A.L., and Nordberg,A. (1998). Tacrine and donepezil attenuate the neurotoxic effect of A beta(25-35) in rat PC12 cells. *Neuroreport* 9, 1519-1522.
- Szegletes,T., Mallender,W.D., and Rosenberry,T.L. (1998). Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochemistry* 37, 4206-4216.
- Szegletes,T., Mallender,W.D., Thomas,P.J., and Rosenberry,T.L. (1999). Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* 38, 122-133.
- Tagliavini,F., Lievens,P.M., Tranchant,C., Warter,J.M., Mohr,M., Giaccone,G., Perini,F., Rossi,G., Salmona,M., Piccardo,P., Ghetti,B., Beavis,R.C., Bugiani,O., Frangione,B., and Prelli,F. (2001). A 7-kDa prion protein (PrP) fragment, an integral component of the PrP region required for infectivity, is the major amyloid protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease A117V. *J. Biol. Chem.* 276, 6009-6015.
- Tagliavini,F., Prelli,F., Verga,L., Giaccone,G., Sarma,R., Gorevic,P., Ghetti,B., Passerini,F., Ghibaudi,E., Forloni,G., and . (1993). Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 90, 9678-9682.
- Takada,Y., Yonezawa,A., Kume,T., Katsuki,H., Kaneko,S., Sugimoto,H., and Akaike,A. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 772-777.
- Takada-Takatori,Y., Kume,T., Sugimoto,M., Katsuki,H., Sugimoto,H., and Akaike,A. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology* 51, 474-486.
- Taly,A., Corringer,P.J., Guedin,D., Lestage,P., and Changeux,J.P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 733-750.
- Tamagno,E., Bardini,P., Obbili,A., Vitali,A., Borghi,R., Zaccheo,D., Pronzato,M.A., Danni,O., Smith,M.A., Perry,G., and Tabaton,M. (2002). Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol. Dis.* 10, 279-288.

- Tamagno,E., Parola,M., Bardini,P., Piccini,A., Borghi,R., Guglielmotto,M., Santoro,G., Davit,A., Danni,O., Smith,M.A., Perry,G., and Tabaton,M. (2005). Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J. Neurochem.* 92, 628-636.
- Tamagno,E., Robino,G., Obbili,A., Bardini,P., Aragno,M., Parola,M., and Danni,O. (2003). H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK. *Exp. Neurol.* 180, 144-155.
- Tang,L.L., Wang,R., and Tang,X.C. (2005). Huperzine A protects SHSY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress damage via nerve growth factor production. *Eur. J. Pharmacol.* 519, 9-15.
- Tang,X.C., De,S.P., Sugaya,K., and Giacobini,E. (1989). Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat. *J. Neurosci. Res.* 24, 276-285.
- Tang,X.C., and Han,Y.F. (1999). Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from a chinese herb. 5 300.
- Taraboulos,A., Jendroska,K., Serban,D., Yang,S.L., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (1992). Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 7620-7624.
- Taraboulos,A., Scott,M., Semenov,A., Avrahami,D., Laszlo,L., and Prusiner,S.B. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129, 121-132.
- Tayebati,S.K., El-Assouad,D., Ricci,A., and Amenta,F. (2002). Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 132, 147-155.
- Taylor,P., and Lappi,S. (1975). Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. *Biochemistry* 14, 1989-1997.
- Taylor,P., and Radic,Z. (1994). The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 281-320.
- Telling,G.C., Scott,M., Mastrianni,J., Gabizon,R., Torchia,M., Cohen,F.E., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.
- Thathiah,A., and De,S.B. (2009). G protein-coupled receptors, cholinergic dysfunction, and Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Sci Signal.* 2, re8.

- Thinakaran,G., and Koo,E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615-29619.
- Thomas,T., McLendon,C., Sutton,E.T., and Thomas,G. (1997). Cerebrovascular endothelial dysfunction mediated by beta-amyloid. *Neuroreport* 8, 1387-1391.
- Thomas,T., Thomas,G., McLendon,C., Sutton,T., and Mullan,M. (1996). beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 380, 168-171.
- Thomsen,T., Kaden,B., Fischer,J.P., Bickel,U., Barz,H., Gusztony,G., Cervos-Navarro,J., and Kewitz,H. (1991). Inhibition of acetylcholinesterase activity in human brain tissue and erythrocytes by galanthamine, physostigmine and tacrine. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 29, 487-492.
- Tong,Y., Zhou,W., Fung,V., Christensen,M.A., Qing,H., Sun,X., and Song,W. (2005). Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Abeta generation. *J. Neural Transm.* 112, 455-469.
- Utsuki,T., Shoaib,M., Holloway,H.W., Ingram,D.K., Wallace,W.C., Haroutunian,V., Sambamurti,K., Lahiri,D.K., and Greig,N.H. (2002). Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat. *J. Alzheimers. Dis.* 4, 405-415.
- Vassar,R., Kovacs,D.M., Yan,R., and Wong,P.C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J. Neurosci.* 29, 12787-12794.
- Vaudry,D., Chen,Y., Ravni,A., Hamelink,C., Elkahloun,A.G., and Eiden,L.E. (2002). Analysis of the PC12 cell transcriptome after differentiation with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J. Neurochem.* 83, 1272-1284.
- Ved,H.S., Koenig,M.L., Dave,J.R., and Doctor,B.P. (1997). Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *Neuroreport* 8, 963-968.
- Wang,R., and Tang,X.C. (2005). Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 14, 71-82.
- Wang,R., Yan,H., and Tang,X.C. (2006). Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 1-26.
- Wang,R., Zhang,H.Y., and Tang,X.C. (2001). Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by beta-amyloid protein-(1-40) in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 421, 149-156.
- Weiner,H.L., and Selkoe,D.J. (2002). Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature* 420, 879-884.

- Weise,C., Kreienkamp,H.J., Raba,R., Pedak,A., Aaviksaar,A., and Hucho,F. (1990). Anionic subsites of the acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: affinity labelling with the cationic reagent N,N-dimethyl-2-phenyl-aziridinium. *EMBO J.* 9, 3885-3888.
- Wermuth,C.G. (2003). *The practice of medical chemistry*. London: Academy press.
- Westaway,D., DeArmond,S.J., Cayetano-Canlas,J., Groth,D., Foster,D., Yang,S.L., Torchia,M., Carlson,G.A., and Prusiner,S.B. (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76, 117-129.
- Wigstrom,H., and Gustafsson,B. (1985). Facilitation of hippocampal long-lasting potentiation by GABA antagonists. *Acta Physiol Scand.* 125, 159-172.
- Woodruff-Pak,D.S., and Santos,I.S. (2000). Nicotinic modulation in an animal model of a form of associative learning impaired in Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 113, 11-19.
- Wynn,Z.J., and Cummings,J.L. (2004). Cholinesterase inhibitor therapies and neuropsychiatric manifestations of Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 17, 100-108.
- Xiao,X.Q., Wang,R., Han,Y.F., and Tang,X.C. (2000a). Protective effects of huperzine A on beta-amyloid(25-35) induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci. Lett.* 286, 155-158.
- Xiao,X.Q., Wang,R., and Tang,X.C. (2000b). Huperzine A and tacrine attenuate beta-amyloid peptide-induced oxidative injury. *J. Neurosci. Res* 61, 564-569.
- Xiao,X.Q., Yang,J.W., and Tang,X.C. (1999). Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Neurosci. Lett.* 275, 73-76.
- Xie,W., Stribley,J.A., Chatonnet,A., Wilder,P.J., Rizzino,A., McComb,R.D., Taylor,P., Hinrichs,S.H., and Lockridge,O. (2000). Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 896-902.
- Yan,S.D., Roher,A., Chaney,M., Zlokovic,B., Schmidt,A.M., and Stern,D. (2000). Cellular cofactors potentiating induction of stress and cytotoxicity by amyloid beta-peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 145-157.
- Yankner,B.A., Lu,T., and Loerch,P. (2008). The aging brain. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 41-66.
- Ye,L., and Qiao,J.T. (1999). Suppressive action produced by beta-amyloid peptide fragment 31-35 on long-term potentiation in rat hippocampus is N-

methyl-D-aspartate receptor-independent: it's offset by (-)huperzine A. *Neurosci. Lett.* 275, 187-190.

Yehiely,F., Bamborough,P., Da,C.M., Perry,B.J., Thinakaran,G., Cohen,F.E., Carlson,G.A., and Prusiner,S.B. (1997). Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol. Dis.* 3, 339-355.

Yoshida,H., Terada,S., Ishizu,H., Ikeda,K., Hayabara,T., Ikeda,K., Deguchi,K., Touge,T., Kitamoto,T., and Kuroda,S. (2009). An autopsy case of Creutzfeldt-Jakob disease with a V180I mutation of the PrP gene and Alzheimer-type pathology. *Neuropathology.*

Zangara,A. (2003). The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 675-686.

Zhang,H.Y., Liang,Y.Q., Tang,X.C., He,X.C., and Bai,D.L. (2002). Stereoselectivities of enantiomers of huperzine A in protection against beta-amyloid(25-35)-induced injury in PC12 and NG108-15 cells and cholinesterase inhibition in mice. *Neurosci. Lett.* 317, 143-146.

Zhang,H.Y., and Tang,X.C. (2000). Huperzine B, a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 292, 41-44.

Zhang,H.Y., Zheng,C.Y., Yan,H., Wang,Z.F., Tang,L.L., Gao,X., and Tang,X.C. (2008). Potential therapeutic targets of huperzine A for Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chem. Biol. Interact.* 175, 396-402.

Zhang,L., Zhou,F.M., and Dani,J.A. (2004). Cholinergic drugs for Alzheimer's disease enhance in vitro dopamine release. *Mol. Pharmacol.* 66, 538-544.

Zhao,Q., and Tang,X.C. (2002). Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *Eur. J. Pharmacol.* 455, 101-107.

Zhou,J., Fu,Y., and Tang,X.C. (2001). Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 306, 53-56.

Zhu,X., Raina,A.K., Perry,G., and Smith,M.A. (2006). Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability. *Curr. Alzheimer Res* 3, 393-396.

Zwart,R., van Kleef,R.G., Gotti,C., Smulders,C.J., and Vijverberg,H.P. (2000). Competitive potentiation of acetylcholine effects on neuronal nicotinic receptors by acetylcholinesterase-inhibiting drugs. *J. Neurochem.* 75, 2492-2500.

Zwart,R., and Vijverberg,H.P. (1997). Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol. Pharmacol.* 52, 886-895.



LA NÒVIA. Gustav Klimt

ANNEX

Acetylcholinesterase triggers the aggregation of PrP 106–126 [☆]

M. Pera ^a, S. Román ^a, M. Ratia ^a, P. Camps ^c, D. Muñoz-Torrero ^c, L. Colombo ^b,
C. Manzoni ^b, M. Salmona ^b, A. Badia ^a, M.V. Clos ^{a,*}

^a *Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia, Institut Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

^b *Department of Molecular Biochemistry and Pharmacology, Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”, Milan, Italy*

^c *Laboratori de Química Farmacèutica (Unitat Associada al CSIC), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 24 April 2006

Available online 24 May 2006

Abstract

Acetylcholinesterase (AChE), a senile plaque component, promotes amyloid- β -protein (A β) fibril formation in vitro. The presence of prion protein (PrP) in Alzheimer’s disease (AD) senile plaques prompted us to assess if AChE could trigger the PrP peptides aggregation as well. Consequently, the efficacy of AChE on the PrP peptide spanning-residues 106–126 aggregation containing a coumarin fluorescence probe (coumarin-PrP 106–126) was studied. Kinetics of coumarin-PrP 106–126 aggregation showed a significant increase of maximum size of aggregates (MSA), which was dependent on AChE concentration. AChE-PrP 106–126 aggregates showed the tinctorial and optical amyloid properties as determined by polarized light and electronic microscopy analysis. A remarkable inhibition of MSA was obtained with propidium iodide, suggesting that AChE triggers PrP 106–126 and A β aggregation through a similar mechanism. Huprines (AChE inhibitors) also significantly decreased MSA induced by AChE as well, unveiling the potential interest for some AChE inhibitors as a novel class of potential anti-prion drugs.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Acetylcholinesterase; Acetylcholinesterase inhibitors; Huprines; Amyloid aggregation process; Amyloid- β -protein; Alzheimer’s disease; Prion protein; PrP 106–126

Transmissible spongiform encephalopathies are caused by an extra-cellular surface protein, the scrapie prion protein (PrP^{Sc}), which is an aberrant form of normal and functional cellular prion protein (PrP^C). The pathological hallmarks of these diseases are the accumulation and deposition of PrP^{Sc} in the form of amyloid fibrils in the central nervous system [1]. The transition from PrP^C to PrP^{Sc} involves conformational changes with a decrease in the α -helical and an increase in the β -sheet secondary-structure content [2]. This conversion reaction induces remarkable

changes in the physicochemical properties of the protein, including insolubility in non-denaturing detergents and partial resistance to proteinase K digestion [3].

In some Alzheimer’s disease (AD) patients, amyloid- β -peptide (A β) and prion pathologies coexist [4,5]. Actually, a common spatial pattern of protein deposition in both pathologies has also been described [6], and the nature, size, and morphology of multicentric PrP^{Sc} plaques are similar to A β -immunoreactive senile plaques [7]. In addition, A β -positive senile plaques in AD brains commonly contain PrP deposits [5], while sporadically A β -positive senile plaques have also been identified in prion diseases such as Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) and Gerstmann–Sträussler–Scheinker disease (GSS) [4,8]. The interrelations between the cholinergic system and PrP^C were suggested owing to the location of prion protein at the neuromuscular junction [9] and the co-immunoprecipitation with the β -4 subunit nicotinic receptor in the normal

[☆] *Abbreviations:* AChE, acetylcholinesterase; A β , amyloid- β -protein; AD, Alzheimer’s disease; PrP, prion protein; MSA, maximum size of aggregates; PrP^C, cellular prion protein; PrP^{Sc}, disease specific prion protein; CJD, Creutzfeldt–Jakob disease; GSS, Gerstmann–Sträussler–Scheinker disease.

* Corresponding author. Fax: +34 935812986.

E-mail address: Victoria.Clos@uab.es (M.V. Clos).

human brain [10]. In addition, an implication of prion proteins in the regulation of the acetylcholine receptor number at the neuromuscular junction and in the central nervous system has also been proposed [11].

Although the mechanism underlying amyloid protein aggregation still remains obscure, it has been demonstrated that acetylcholinesterase (AChE), an important component of cholinergic synapses, co-localizes with A β deposits in AD brains and accelerates assembly of amyloid- β peptides [12]. This non-catalytic function of the enzyme has been related to the peripheral anionic site close to the entrance of the active site gorge and it has been widely described that AChE directly promotes the aggregation of A β peptide into amyloid fibrils through this peripheral site [12–14]. Moreover, this amyloidogenic effect of AChE is inhibited by propidium iodide, a purely non-specific cholinesterase inhibitor (AChEI) [15], which binds to the peripheral site decreasing A β peptide aggregation, and a similar effect can be observed with the non-selective bisquaternary inhibitor, decamethonium [16]. On the contrary, active-site competitive inhibitors, such as edrophonium, did not show any inhibitory effect on A β aggregation [16].

In light of these observations, we explored the capacity of AChE to trigger the aggregation of a peptide comprising residues 106–126 of prion protein (PrP 106–126), which corresponds to a segment considered central to both the process of conversion reaction and the pathogenic properties of abnormal PrP isoforms. In fact, this peptide showed high propensity to adopt stable β -sheet secondary structure and to assemble into straight, unbranched amyloid fibrils, ultrastructurally similar to those observed in GSS patients [17–19]. It also induced apoptotic death in primary cultures of hippocampal [20], cortical [21], and cerebral neurons [22], and exerted a trophic action on glial cells [23]. The data reported in this paper indicate that similar to A β , PrP 106–126 aggregation is triggered by AChE through an identical mechanism.

Materials and methods

Peptide synthesis. The peptide corresponding to the 106–126 segment (KTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG) of the human prion protein and a scrambled sequence thereof (NGAKALMGGHGATKVMVGAAA) were synthesized using solid-phase chemistry with a 433A instrument (Applied Biosystems). Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) was used as the protective group for amine residues, and 1-hydroxybenzotriazole and *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide as activators of carboxylic residues.

Fluorescent peptides were synthesized using Fmoc-K(methoxycoumarin)-OH and a single coumarin moiety was introduced into K106 and K109 residues in the wild type and scrambled sequences, respectively. Peptides were purified by HPLC as previously described [19]; their purity being always above 99.5%.

Time course of AChE-induced PrP 106–126 aggregation. Lyophilized aliquots of the PrP 106–126 peptide and its scrambled analogue, and coumarin-PrP 106–126 and its scrambled analogues were suspended in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, at a concentration of 1 mM. For the formation of amyloid fibrils samples were vigorously mixed and incubated for different interval of times (0, 1, 5, 24, and 72 h) at room temperature and centrifuged at 13,000g for 10 min to separate the aggregates from soluble peptide [17]. To evaluate the effectiveness of bovine AChE

(Sigma–Aldrich) to trigger PrP 106–126 aggregation to a greater extent co-incubation experiments were carried out with different final concentrations of AChE, ranging from 0.31 to 2.5 μ M, and incubated for 48 h at room temperature. At the end of the incubation, samples were immediately deep-frozen and stored at -20° C until analysis.

To evaluate the effect of AChE on aggregation of coumarin-PrP 106–126 and its scrambled analogue, peptide pellets were washed several times with 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, suspended in 10 μ L of the same buffer, placed on gelatin-coated slides, and analyzed by fluorescence microscopy (Olympus BXJ1; DAPI filter). Three images of each replicate were selected (at least four experiments run in triplicate) and the maximum size of aggregates (MSA, μ m²) of each image was determined using a standard-image analysis program (Leica Qwin). This value was used to quantify the effects of enzyme and its inhibitors on the aggregation process of PrP 106–126. In no case was the presence of fluorescent aggregates observed in the scrambled coumarin-PrP 106–126 samples in both in the presence or absence of AChE.

Inhibition of AChE-induced PrP 106–126 aggregation by AChE inhibitors. PrP 106–126 or coumarin-PrP 106–126 were incubated in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, for 48 h at room temperature at a final concentration of 1 mM in the presence of different concentrations of non-specific and specific AChE inhibitors, such as propidium iodide concentrations (0.01–100 μ M), and huperzine A and tacrine (100 μ M) (Sigma–Aldrich), respectively. Huprine X, huprine Y, huprine Z (100 μ M) (Laboratori de Química Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain) a new group of AChE inhibitors obtained by hybridation of huperzine A and tacrine were also evaluated. Parallel control samples devoid of inhibitors or in the presence of inhibitors without AChE were always run. After incubation for 48 h at room temperature, samples were immediately deep-frozen and stored at -20° C until analysis.

Light and electron microscopy. Peptide pellets were washed several times with 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, suspended in 10 μ L of the same buffer. Samples were air-dried on gelatin-coated slides, stained with 0.2% Congo Red in 80% ethanol saturated with NaCl, and viewed under polarized light (Leitz DM RB, Oberkochen, Germany). For ultrastructural examination, 5 μ L of suspension was applied to Formvar-carbon 200-mesh nickel grids for 2 min, negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate, and observed in an electron microscope (Hitachi H-7000, Hitachi Ltd, Tokyo, Japan).

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Variances of groups were compared using one-way ANOVA followed by Dunnett's test for multiple comparisons when appropriate. Differences were established at $p < 0.05$.

Results and discussion

It has been described that A β -positive senile plaques in AD brains commonly contain PrP deposits [4,5], and A β - and PrP-positive senile plaques in prion diseases such as CJD and GSS disease have been detected [4,8]. AChE, an important component of cholinergic synapses, co-localizes with A β deposits in AD brains and directly promotes the aggregation of A β -protein into amyloid fibrils through the peripheral anionic site [12–14]. This effect is blocked by propidium iodide, a selective ligand for the peripheral site of AChE [15]. On the other hand, the synthetic PrP 106–126 peptide that shares some chemophysical and biological properties with human PrP [17,18,20] adopts β -sheet secondary structure and forms amyloid fibrils as that which occurs with A β -protein deposition [24]. Therefore, this study stems from the hypothesis that AChE could play a role in PrP aggregation.

Fluorescence microscopy analysis showed that the formation of coumarin-PrP 106–126 aggregates is extremely rapid since the MSA value already reached the peak value after 1 h

($983 \pm 102 \mu\text{m}^2$ after 1 h as compared to $1111 \pm 137 \mu\text{m}^2$ after 72 h, Fig. 1). These data are consistent with those previously reported in sedimentation experiments reporting that the soluble peptide fraction was already undetectable in the supernatant after 1 h of incubation [25]. Time-

course experiments carried out in the presence of AChE (2.5 μM) showed a significant and progressive increase of MSA, achieving higher values between 48 h and 72 h of incubation ($13,600 \pm 136$ and $13,943 \pm 502 \mu\text{m}^2$, respectively; $p < 0.001$; Figs. 1 and 3A). Remarkably, after 1 h of

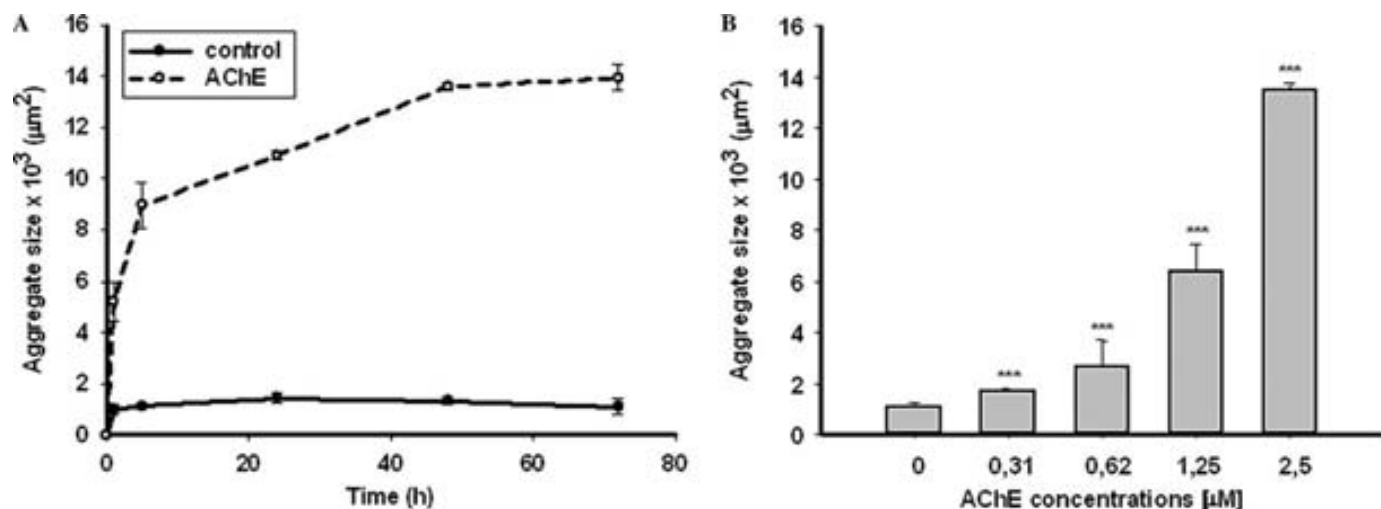


Fig. 1. (A) Time-course of MSA (maximum aggregate size) formation of coumarin-PrP 106–126 (1 mM) in the absence or in the presence of AChE (2.5 μM) in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, at room temperature. (B) MSA values of coumarin-PrP 106–126 (1 mM) incubated for 48 h with increasing AChE concentrations. Samples were analyzed by light fluorescence microscopy and the MSA was quantified by the Leica Qwin standard-image analysis program. Results are expressed as means \pm SEM of the maximum size of aggregates (MSA; μm^2) of at least four experiments run in triplicate. *** $p < 0.001$ versus control group.

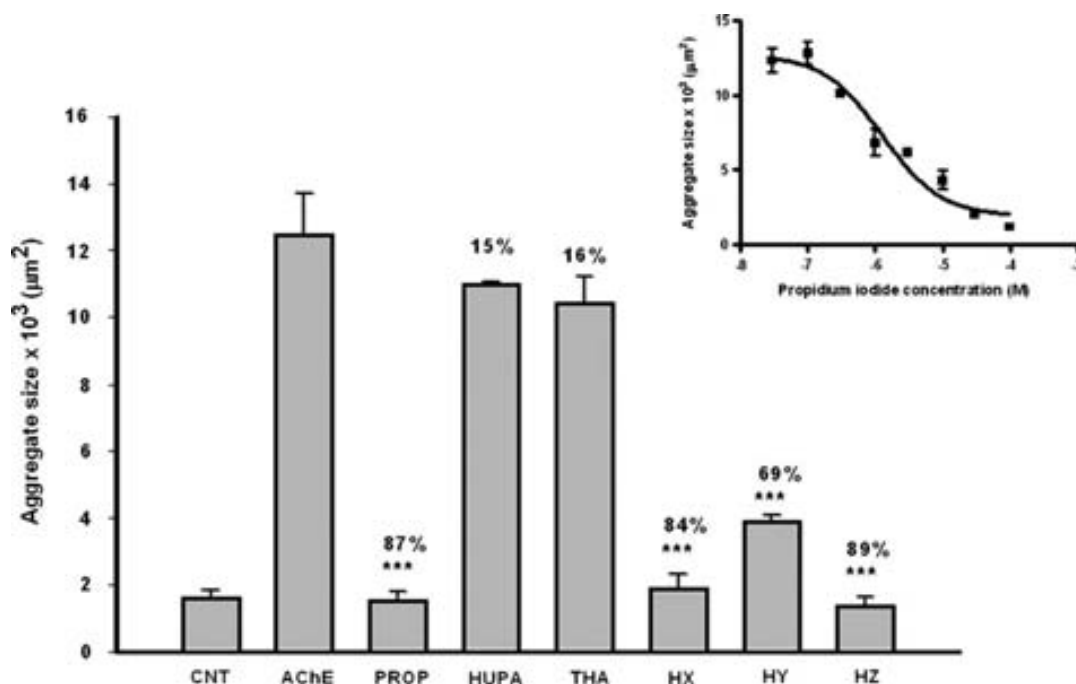


Fig. 2. Inhibition of AChE-induced aggregation of coumarin-PrP 106–126 by AChE inhibitors after 48 h of incubation assayed at a concentration of 100 μM : PROP (propidium iodide), HUPA (huperzine A), THA (tacrine), HX (huprine X), HY (huprine Y), and HZ (huprine Z). Values above bars represent the percentage of inhibition of MSA induced by AChEI. Inset represents concentration-response curve of propidium iodide in the presence of 2.5 μM AChE ($\text{IC}_{50} = 1.27 \pm 0.1 \mu\text{M}$) after 48 h of incubation. The IC_{50} (molar concentration of drug which produces the 50% of maximal effect) value was calculated by nonlinear regression analysis of experimental data using GraphPad Prism program (GraphPad Software Inc., California). Results are expressed as means \pm SEM of the maximum size of aggregates (MSA; μm^2) of at least 4 experiments run in triplicate. *** $p < 0.001$ versus AChE group.

incubation, MSA values ($5224 \pm 563 \mu\text{m}^2$) were much higher than control samples devoid of AChE. The kinetics of aggregation of coumarin-PrP 106–126 was more pronounced and constant in time, as compared to A β , since A β attained the highest value of aggregation after 8 h of incubation [13,14]. In our experimental conditions, the highest aggregation was obtained between 48 and 72 h of incubation, and MSA values were approximately 12-fold higher than those of control samples. Moreover, a positive correlation between AChE concentration and coumarin-PrP 106–126 aggregation was also observed (Fig. 2) similar to previously described for A β [13,14].

Although there is no evident sequence or structural homology among the proteins involved in protein conformational disorders, there is accumulating evidence that the aggregates formed by misfolded proteins have the same final molecular structure [24]. Studies using shorter A β fragments have shown that the internal hydrophobic region between aminoacids 17 and 21 is the most important for the early steps of A β misfolding and aggregation, indicating that A β assembly is partially driven by hydrophobic interactions [26]. Similar studies on PrP conversion reaction have identified the 106–126 hydrophobic segment as relevant for protein aggregation [18]. The finding that hydrophobic sequences are critical for A β and PrP aggregation indicates that protein

aggregation is driven by the exposure of hydrophobic residues to the surface of the misfolded protein [24].

The structural peripheral anionic motif of AChE involved in the binding with A β is a hydrophobic sequence exposed on the surface of the enzyme and it has been demonstrated that a synthetic 35-residue peptide corresponding to such sequence is incorporated into the growing A β fibrils by a hydrophobic interaction [27]. A β has a marked tendency to interact with hydrophobic environments and it has been reported that hydrophobic interactions may play a role in stabilizing the AChE-A β complex [13].

PrP 106–126 shows a conformational polymorphism in solution which supports the role of this fragment in the structural transition of the native to the abnormal form of PrP in response to changes in the local environmental conditions [19]. Molecular dynamic simulations carried out in different environments have shown an increased presence of helical structures in apolar solvents, in agreement with the results from circular dichroism spectroscopy. In water solution, β -sheet elements were observed between residues 108 and 112 and either residues 115–121 or 121–126. An α -transition was observed under neutral conditions. In dimethyl sulfoxide the peptide adopted an extended conformation, in agreement with nuclear magnetic resonance experiments [28]. It can therefore be postulated that the remarkable increase of

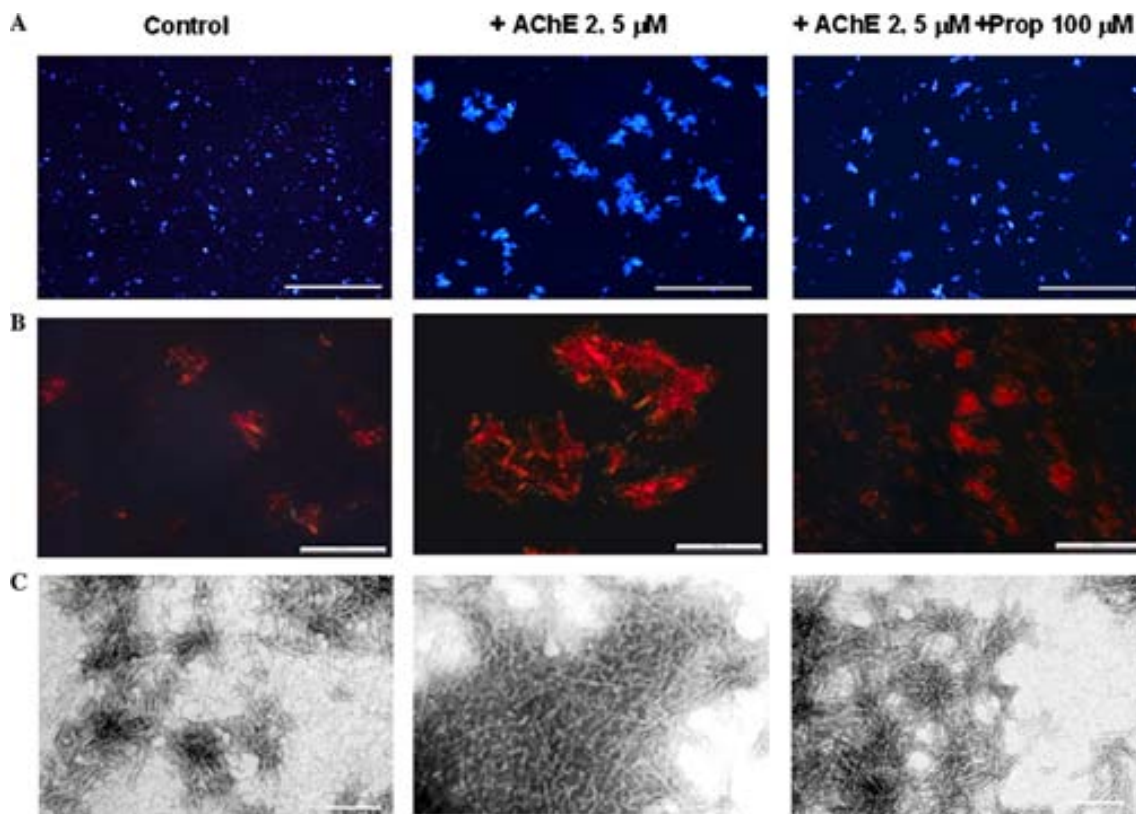


Fig. 3. (A) Fluorescence micrographs of aggregates generated in vitro by coumarin-PrP 106–126 (1 mM): (1) controls, (2) AChE 2.5 μM , and (3) AChE and propidium iodide (100 μM) following 48 h of incubation. Magnification 10 \times . Scale bar 100 μm . (B) Congo Red staining of PrP 106–126 (1 mM) aggregates analyzed by polarized light microscopy: (1) controls, (2) AChE 2.5 μM , and (3) AChE and propidium iodide (100 μM) following 48 h of incubation. Magnification 40 \times . Scale bar 50 μm . (C) Electron micrographs of aggregates generated in vitro by PrP 106–126 (1 mM), as revealed by negative staining of peptide suspensions: (1) controls, (2) AChE 2.5 μM , and (3) AChE and propidium iodide (100 μM) following 48 h of incubation. Magnification 70,000 \times . Scale bar 100 nm.

PrP 106–126 aggregation by AChE is mediated by the interaction with the structural peripheral anionic motif of the enzyme.

The nature of aggregates generated by PrP 106–126 in the absence and in the presence of AChE was examined under polarized light and electronic microscopy. As reported in Fig. 3B, macromolecular assemblies of PrP 106–126 and AChE-PrP 106–126 showed the tinctorial and optical properties of in situ amyloid, i.e., birefringence under polarized light after Congo Red staining. Birefringent properties of aggregates were more evident when AChE was present owing to the remarkable increase in the size of aggregates. The amyloid structure of the aggregates was also confirmed by electron microscope analysis. In the absence and in the presence of AChE, negative-stained PrP 106–126 assemblies showed that aggregates are composed of 4–8 nm thick unbranched fibrils, and no major morphological differences were detected among them (Fig. 3C). The amount of amyloid fibers found on the electron microscope grids was higher in the presence of the enzyme.

Propidium iodide is the most specific inhibitor interacting at the peripheral site of AChE, [15] and it has been extensively demonstrated that it inhibits the AChE-induced A β aggregation [12–14]. Accordingly, when coumarin-PrP 106–126 and AChE were co-incubated with propidium iodide, an IC₅₀ of 1.27 \pm 0.1 μ M was obtained and an inhibition of 87% of MSA was observed at 100 μ M (Figs. 2 and 3A). This value is almost identical to that previously described for AChE-induced A β aggregation under similar experimental conditions [14]. Therefore, the fact that propidium iodide, a specific inhibitor binding to the peripheral site of the enzyme, was able to revert the effect of AChE on PrP 106–126 aggregation in a concentration-dependent manner, strongly suggests that AChE induces PrP 106–126 and A β aggregation through the same site.

Using the same experimental conditions tacrine and huperzine A were devoid of any significant anti-aggregating effect, with a percentage of inhibition very similar to that previously reported for AChE-induced A β aggregation in the case of tacrine [14]. Although it has been recently demonstrated that some tacrine-based heterodimers can inhibit the AChE-induced A β aggregation [29], it is known that both tacrine and huperzine A show a high affinity for the catalytic site of AChE but not to the peripheral anionic one [30,31]. Huprines have recently emerged as a new class of potent and selective acetylcholinesterase inhibitors, which were designed from tacrine and huperzine A through a conjunctive approach [32–34]. Although huprines bind preferentially to the acylation site of AChE, experimental data and molecular modeling studies have demonstrated that the huprine X binding geometry and its molecular volume result in a significant decrease in the affinity of ligands to the peripheral site of the enzyme [34]. Huprines included in the present study clearly inhibited the AChE-induced PrP 106–126 aggregation in a percentage of inhibition near to that obtained in the presence of propidium

(100 μ M), especially huprine X and huprine Z (84% and 89%, respectively; Fig. 2), while huprine Y induced an anti-aggregating effect of 63%.

In conclusion, we report here, for the first time, that AChE induces a remarkable aggregation of PrP 106–126 with a mechanism similar to that described for A β . Noteworthy, the analysis carried out by polarized light and electron microscopy confirmed the amyloid nature of peptide assemblies. The inhibition of this effect by propidium iodide indicates the involvement of the AChE peripheral anionic site, suggesting that the pro-aggregating effect of this enzyme could play a more general role in the process of amyloid formation that is not confined to A β . In addition, our data unveil the relevance of some AChE inhibitors as potential anti-prion drugs.

Acknowledgments

We acknowledge the technical assistance of the Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària and of the Servei de Microscòpia from the Universitat Autònoma de Barcelona. This work was supported by DGICYT (SAF2002-00049) and CIRIT (2001SGR00216), the European Union within the frame of Neuroprion and Heteroprion networks (Contract No: FOOD-CT-2004-506579), Negri-Weizmann Foundation (2006), the Italian Ministry of University and Research (FIRB Protocol RBNE03PX83, 2005), and Fondazione Cariplo (Project Genoproteomics of Age Related Disorders, 2006).

References

- [1] J. Tateishi, T. Kitamoto, H. Hashiguchi, H. Shii, Gerstmann–Straussler–Scheinker disease: immunohistological and experimental studies, *Ann. Neurol.* 24 (1988) 35–40.
- [2] K.M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen, et al., Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10962–10966.
- [3] S.B. Prusiner, Molecular biology of prion diseases, *Science* 252 (1991) 1515–1522.
- [4] J.A. Hainfellner, J. Wanschitz, K. Jellinger, P.P. Liberski, F. Gullotta, H. Budka, Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt–Jakob disease, *Acta Neuropathol.* 96 (1998) 116–122.
- [5] K. Schwarze-Eicker, K. Keyvani, N. Gortz, D. Westaway, N. Sachser, W. Paulus, Prion protein (PrP(c)) promotes beta-amyloid plaque formation, *Neurobiol. Aging* 26 (2005) 1177–1182.
- [6] R.A. Armstrong, P.L. Lantos, N.J. Cairns, Spatial correlations between the vacuolation, prion protein deposits, and surviving neurons in the cerebral cortex in sporadic Creutzfeldt–Jakob disease, *Neuropathology* 21 (2001) 266–271.
- [7] G.G. Kovacs, H. Budka, Aging, the brain and human prion disease, *Exp. Gerontol.* 37 (2002) 603–606.
- [8] M. Miyazono, T. Kitamoto, T. Iwaki, J. Tateishi, Colocalization of prion protein and beta protein in the same amyloid plaques in patients with Gerstmann–Straussler syndrome, *Acta Neuropathol.* 83 (1992) 333–339.
- [9] C. Gohel, V. Grigoriev, F. Escaig-Haye, C.I. Lasmezas, J.P. Deslys, J. Langeveld, M. Akaaboune, D. Hantai, J.G. Fournier, Ultrastructural

- localization of cellular prion protein (PrP_c) at the neuromuscular junction, *J. Neurosci. Res.* 55 (1999) 261–267.
- [10] S. Petrakis, I. Paspaltsis, J. Lindstrom, T. Sklaviadis, PrP_c coimmunoprecipitates with nicotinic acetylcholine receptor B4 subunit in normal human brain. First international congress of neuroprion (France) (2004).
- [11] D.A. Harris, P. Lele, W.D. Snider, Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 4309–4313.
- [12] N.C. Inestrosa, A. Alvarez, C.A. Perez, R.D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O.I. Casanueva, C. Soto, J. Garrido, Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme, *Neuron* 16 (1996) 881–891.
- [13] A. Alvarez, C. Opazo, R. Alarcon, J. Garrido, N.C. Inestrosa, Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils, *J. Mol. Biol.* 272 (1997) 348–361.
- [14] M. Bartolini, C. Bertucci, V. Cavrini, V. Andrisano, beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 407–416.
- [15] T. Szegletes, W.D. Mallender, P.J. Thomas, T.L. Rosenberry, Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect, *Biochemistry* 38 (1999) 122–133.
- [16] E.O. Campos, A. Alvarez, N.C. Inestrosa, Brain acetylcholinesterase promotes amyloid-beta-peptide aggregation but does not hydrolyze amyloid precursor protein peptides, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 135–140.
- [17] C. Selvaggini, L. De Gioia, L. Cantu, E. Ghibaudi, L. Diomedea, F. Passerini, G. Forloni, O. Bugiani, F. Tagliavini, M. Salmona, Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106–126 of the prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 (1993) 1380–1386.
- [18] F. Tagliavini, F. Prelli, L. Verga, G. Giaccone, R. Sarma, P. Gorevic, B. Ghetti, F. Passerini, E. Ghibaudi, G. Forloni, M. Salmona, O. Bugiani, B. Frangione, Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106–147 form amyloid-like fibrils in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 9678–9682.
- [19] L. De Gioia, C. Selvaggini, E. Ghibaudi, L. Diomedea, O. Bugiani, G. Forloni, F. Tagliavini, M. Salmona, Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106–126 of the prion protein, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 7859–7862.
- [20] G. Forloni, N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, F. Tagliavini, Neurotoxicity of a prion protein fragment, *Nature* 362 (1993) 543–546.
- [21] S. Thellung, T. Florio, A. Corsaro, S. Arena, M. Merlino, M. Salmona, F. Tagliavini, O. Bugiani, G. Forloni, G. Schettini, Intracellular mechanisms mediating the neuronal death and astrogliosis induced by the prion protein fragment 106–126, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18 (2000) 481–492.
- [22] S. Thellung, T. Florio, V. Villa, A. Corsaro, S. Arena, C. Amico, M. Robello, M. Salmona, G. Forloni, O. Bugiani, F. Tagliavini, G. Schettini, Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106–126, *Neurobiol. Dis.* 7 (2000) 299–309.
- [23] F.B. Hafiz, D.R. Brown, A model for the mechanism of astrogliosis in prion disease, *Mol. Cell Neurosci.* 16 (2000) 221–232.
- [24] C. Soto, Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 40–60.
- [25] M. Salmona, P. Malesani, L. De Gioia, S. Gorla, M. Bruschi, A. Molinari, V.F. Della, B. Pedrotti, M.A. Marrari, T. Awan, O. Bugiani, G. Forloni, F. Tagliavini, Molecular determinants of the physicochemical properties of a critical prion protein region comprising residues 106–126, *Biochem. J.* 342 (1999) 207–214.
- [26] C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C.L. Masters, K. Beyreuther, Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease beta A4 peptides, *J. Mol. Biol.* 228 (1992) 460–473.
- [27] G.V. De Ferrari, M.A. Canales, I. Shin, L.M. Weiner, I. Silman, N.C. Inestrosa, A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation, *Biochemistry* 40 (2001) 10447–10457.
- [28] A. Villa, A.E. Mark, G.A. Saracino, U. Cosentino, D. Pitea, G. Moro, M. Salmona, Conformational polymorphism of the PrP 106–126 peptide in different environments: a molecular dynamics study, *J. Phys. Chem. B Condens. Matter Mater. Surf. Interfaces. Biophys.* 110 (2006) 1423–1428.
- [29] P. Munoz-Ruiz, L. Rubio, E. Garcia-Palomero, I. Dorronsoro, M. Monte-Millan, R. Valenzuela, P. Usan, C. de Austria, M. Bartolini, V. Andrisano, A. Bidon-Chanal, M. Orozco, F.J. Luque, M. Medina, A. Martinez, Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 7223–7233.
- [30] H.A. Berman, K. Leonard, Interaction of tetrahydroaminoacridine with acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Mol. Pharmacol.* 41 (1992) 412–418.
- [31] N. Ariel, A. Ordentlich, D. Barak, T. Bino, B. Velan, A. Shafferman, The 'aromatic patch' of three proximal residues in the human acetylcholinesterase active centre allows for versatile interaction modes with inhibitors, *Biochem. J.* 335 (1998) 95–102.
- [32] A. Badia, J.E. Baños, P. Camps, J. Contreras, D.M. Görbig, D. Muñoz-Torrero, M. Simón, N.M. Vivas, Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998) 427–440.
- [33] P. Camps, R. El Achab, D.M. Gorbic, J. Morral, D. Muñoz-Torrero, A. Badia, J.E. Baños, N.M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, F.J. Luque, Synthesis, in vitro pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 3227–3242.
- [34] P. Camps, B. Cusack, W.D. Mallender, R.E. El Achab, J. Morral, D. Muñoz-Torrero, T.L. Rosenberry, Huperzine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 409–417.



Acetylcholinesterase as an amyloid enhancing factor in PrP82-146 aggregation process

M. Pera^a, A. Martínez-Otero^c, L. Colombo^b, M. Salmona^b, D. Ruiz-Molina^c, A. Badia^a, M.V. Clos^{a,*}

^a Departament Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia. Inst. Neurociències. UAB, Barcelona, Spain

^b Dipartimento di Molecular Pharmacology and Biochemistry, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Via Giuseppe La Masa 19 20156 Milano, Italy

^c Departament de Nanociència Molecular y Materiales Orgánicos.ICMAB-CSIC. UAB, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2008

Revised 9 October 2008

Accepted 16 October 2008

Available online 7 November 2008

Keywords:

Acetylcholinesterase

AChE peripheral site

AChE peripheral site blockers

Amyloid aggregation process

Prion protein

Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease

PrP82-146

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) triggers beta amyloid plaques formation and is associated with amyloid plaques in the brain. Recent studies have demonstrated that AChE promotes the aggregation of PrP106-126, a peptide deduced from the prion protein sequence. In the present study we show that AChE triggers also the fibrillization of the main component of the amyloid plaques -the peptide spanning residues 82-146 (PrP82-146)- found in patients with Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS). The kinetics of PrP82-146 aggregate formation was directly correlated with AChE concentration and mature fibrils showed the fibrillar and optical properties of amyloid. Atomic force microscopy analysis showed that oligomer and amyloid fibril formation were significantly accelerated by AChE. This effect was mediated by the peripheral site of the enzyme since propidium iodide inhibited the fibrillization process. Present results strongly support the role of AChE in triggering amyloidogenesis and the potential therapeutic relevance of peripheral site blocker compounds.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Protein-misfolding disorders include several diseases characterized by the accumulation of misfolded protein aggregates in different tissues. Among them, prion diseases, such as the Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in human and bovine spongiform encephalopathy (BSE), can be transmitted by an infectious process involving a protein, specifically the prion protein (Prusiner, 1998a; Prusiner, 1998b). The most remarkable feature of the prion protein is its ability to be folded into two isoforms, PrP^C (C, cellular form) being the native protein and PrP^{Sc} (Sc, scrapie form) being the pathological conformation. PrP^C is mainly found in the nervous system, but it can also be located on the surface of numerous other cells (Kitamoto et al., 1991). During the pathogenesis of prion disease there is a conformational conversion from PrP^C to PrP^{Sc} consisting of a drastic alteration of the structure as well as of the biochemical properties of protein. PrP^C is a proteinase K sensitive (PK-sensitive), α -helical monomer, whereas PrP^{Sc} is an assembled multimer characterized by enhanced resistance to PK digestion with the prevalence (45%–50%) of a β -structure (Caughey et al., 1991; Pan et al., 1993; Cohen and Prusiner, 1998). Although the mechanisms underlying the PrP^C to PrP^{Sc} conversion are still unclear, the involvement of several different determinants, those in the transmission of the infectivity and the conformational changes of

the protein, has been proposed (Abid and Soto, 2006). These factors may be cellular components which are probably engaged in other functions in the infected cells that accidentally participate in prion conversion. They should not be considered part of the infectious and neurotoxic PrP^{Sc}, but rather host-encoded molecules that aid prion replication (Abid and Soto, 2006).

Despite differences in clinical symptoms and disease evolution, protein-misfolding disorders share some common hallmarks, among them the ability to aggregate and accumulate a protein as fibrillar amyloid deposits (Dobson, 1999; Soto, 2001). No evident sequence or structural homology among the proteins that have been involved in protein-misfolding disorders has been described. However, there is accumulating evidence that the aggregates formed by different misfolding proteins have the same molecular form (Soto, 2003) and the data available indicate that amyloid formation in all disorders follows a seeding-nucleation mechanism (Jarrett and Lansbury, 1993).

A common spatial pattern of protein deposition in Alzheimer's disease and prion pathologies has also been described (Armstrong et al., 2001), and the nature, size, and morphology of multicentric PrP^{Sc} plaques are similar to A β -immunoreactive senile plaques (Kovacs and Budka, 2002). In addition, A β -positive senile plaques in AD brains commonly contain PrP deposits (Schwarze-Eicker et al., 2005), while sporadically A β -positive senile plaques have also been identified in prion diseases such as Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) (Miyazono et al., 1992; Hainfellner et al., 1998). Histochemical and immunochemical methods have

* Corresponding author. Fax: +34 935812986.

E-mail address: victoria.clos@uab.es (M.V. Clos).

revealed that numerous other proteins are associated with amyloid plaque deposits. These proteins include apolipoprotein E (apoE; Namba et al., 1991), α 1-antichymotrypsin (Abraham et al., 1988), heparan sulphate proteoglycans (Snow et al., 1988) and acetylcholinesterase (AChE; Ulrich et al., 1990; Inestrosa et al., 1996a), among others. AChE has been found to colocalize with A β deposits such as those present in pre-amyloid diffuse deposits, mature senile plaques and cerebral blood vessels (Geula et al., 1994; Geula and Mesulam, 1989). A number of reports have appeared providing evidence of secondary, non-catalytic functions for AChE related to the peripheral site of the enzyme (Small et al., 1996), and it has been widely described that AChE directly promotes the aggregation of A β peptide into amyloid fibrils through this peripheral site (Inestrosa et al., 1996b; Bartolini et al., 2003; Inestrosa et al., 2008). Propidium iodide, a blocker of the peripheral site, inhibits the A β aggregation induced by the enzyme (Szegeletes et al., 1999). Based on the common features between prion protein (PrP) and A β , we have recently demonstrated that AChE is able to induce the aggregation of the peptide deduced from prion protein sequence spanning residues 106–126 (PrP106–126) through the peripheral site of the enzyme (Pera et al., 2006).

Biochemical studies have shown that the major component of GSS amyloid is a PrP fragment \sim 7 kDa, spanning residues 81–82 to 144–

153 (Tagliavini et al., 2001). This fragment is an integral part of the minimal sequence that sustains prion replication (Muramoto et al., 1996; Supattapone et al., 1999), so it might play a central role in the conformational transition of PrP^C into PrP^{Sc} and PrP^{Sc} propagation. When synthesized as a peptide, PrP82–146 adopts a secondary structure primarily composed of a β -sheet and turn, and readily forms fibrils with the staining and ultrastructural features of the GSS amyloid (Salmona et al., 2003). In order to thoroughly analyze AChE ability in stimulating the amyloid process, the interaction between AChE with the major component of GSS amyloid was studied using synthetic PrP82–146. To this aim we also used atomic force microscopy (AFM) image analysis since it is a powerful tool to study the fibrilization process of proteins.

Results

Effect of AChE on the PrP82–146 aggregation process

To investigate the ability of AChE in potentiating the assembly of coumarin-PrP82–146, the time-course fluorescence microscopy analysis of protein aggregation was studied. As can be observed in Fig. 1, when the peptide was incubated alone the formation of

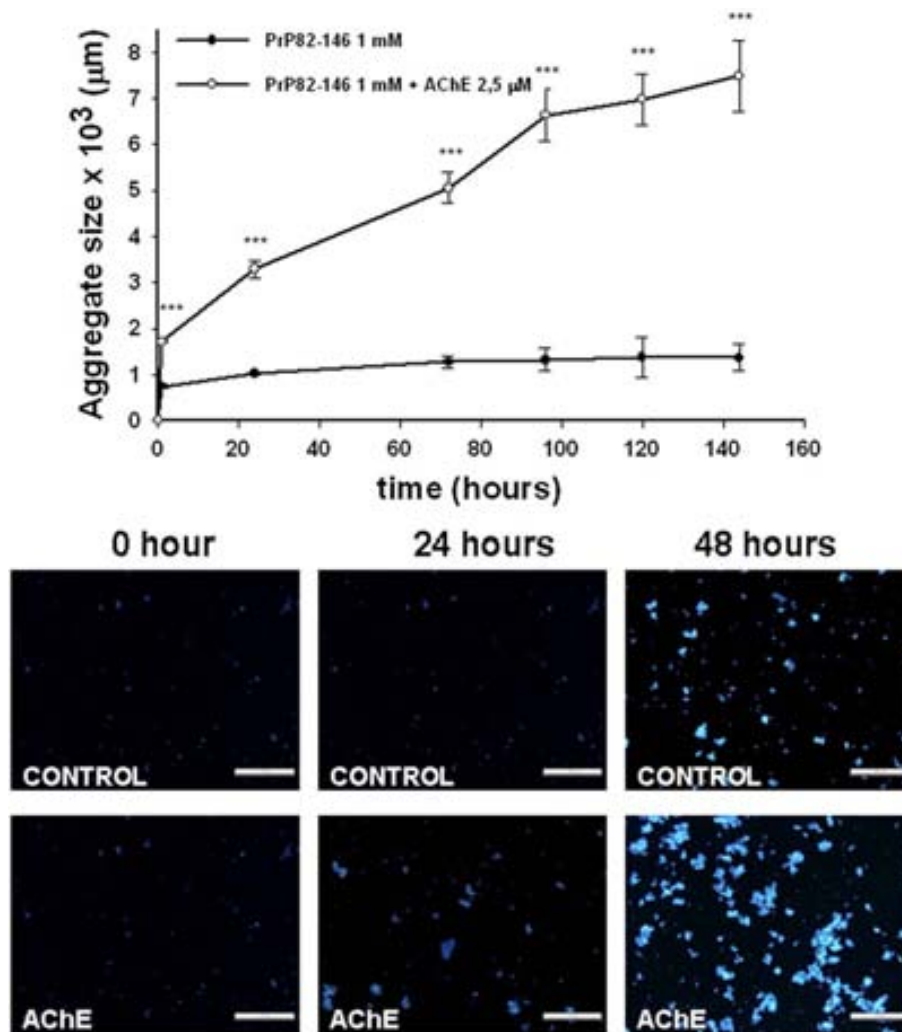


Fig. 1. (A) Time-course of MSA (maximum aggregate size) formation of coumarin-PrP82–146 (1 mM) in the absence or in the presence of AChE (2.5 μ M) in 100 mM Tris–HCl, pH 7.0, at room temperature. Samples were analyzed by light fluorescence microscopy and the MSA was quantified by the Leica Qwin standard-image analysis program. Results are expressed as means \pm SEM of the maximum size of aggregates (MSA; μ m²) of at least four experiments run in triplicate. *** p < 0.001 versus control group. (B) Fluorescence micrographs of aggregates generated *in vitro* by coumarin-PrP82–146 (1 mM) in the absence or in the presence of AChE (2.5 μ M) in 100 mM Tris–HCl, pH 7.0, at room temperature. Samples were quantified by the Leica Qwin standard-image analysis program. Magnification 10 \times . Scale bar 100 μ m.

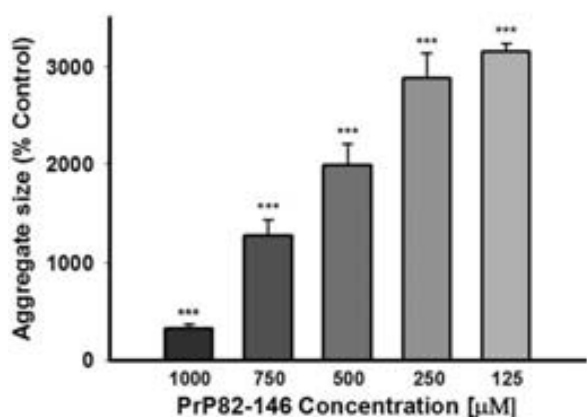


Fig. 2. MSA obtained after incubation of different PrP82-146 concentrations in the presence of AChE (2.5 µM) in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, at room temperature. Results are expressed as means \pm SEM of MSA % of control values (sample without AChE) of at least three experiments run in triplicate. *** p <0.001.

aggregates was substantially rapid since after 1 h of incubation, MSA reached a peak value of $749 \pm 45 \mu\text{m}^2$. This represents 54% of the highest MSA value obtained in the time-course experiment run in the absence of AChE. In no case the presence of fluorescent aggregates was observed in the scrambled coumarin-PrP82-146 samples in both in the presence or absence of AChE. When the experiments were carried out in the presence of the enzyme (AChE 2.5 µM), a significant and progressive increase of MSA was obtained, achieving the highest values between 5 and 6 days after incubation ($6984 \pm 55 \mu\text{m}^2$ and $7490 \pm 78 \mu\text{m}^2$) being approximately 7-fold higher than those of control samples at the same incubation time. It is important to notice that after 1 h of incubation, MSA values increased by 230% over the control samples devoid of AChE. In addition, a negative correlation between coumarin-PrP82-146 and AChE concentrations was observed. Thus, the highest increase of

MSA value was obtained when the PrP82-146:AChE ratio was 50:1 ($3,115 \pm 79\%$; Fig. 2). Co-incubation of PrP82-146, AChE and propidium iodide (100 µM) for 48 h induced a MSA inhibition of $78\% \pm 9\%$ (Fig. 3) and this effect was kept constant throughout the different incubation times (data not shown).

Structural analysis of PrP82-146 aggregates

The staining properties and ultra-structure of aggregates generated by PrP82-146 in the absence and in the presence of AChE were examined under polarized light, electronic transmission and atomic force microscopy.

Polarized Light Microscopy

As reported in Fig. 4B, macromolecular assembly of PrP82-146 showed the tinctorial and optical properties of *in situ* amyloid, i.e., birefringence under polarized light after Congo Red staining. Birefringent properties of aggregates were more evident when AChE was present owing to the remarkable increase in the size of aggregates. However, when propidium iodide (100 µM), an inhibitor of the peripheral site of AChE, was added to the incubation medium, the size of aggregates was significantly reduced (Fig. 4B).

Electronic Microscopy

The amyloid structure of the aggregates was also confirmed by electron microscope analysis. In the absence and in the presence of AChE, negative-stained PrP82-146 assemblies showed that aggregates are composed of 4–9 nm-thick unbranched fibrils, and no major morphological differences were detected among them (Fig. 4B). The amount of amyloid fibers found on the electron microscope grids was higher in the presence of the enzyme, while a decrease in the number of fibres was detected in the samples incubated with in the presence of propidium iodide 100 µM. When scrambled-PrP82-146 was analyzed under the same conditions no aggregates were observed. (data not shown).

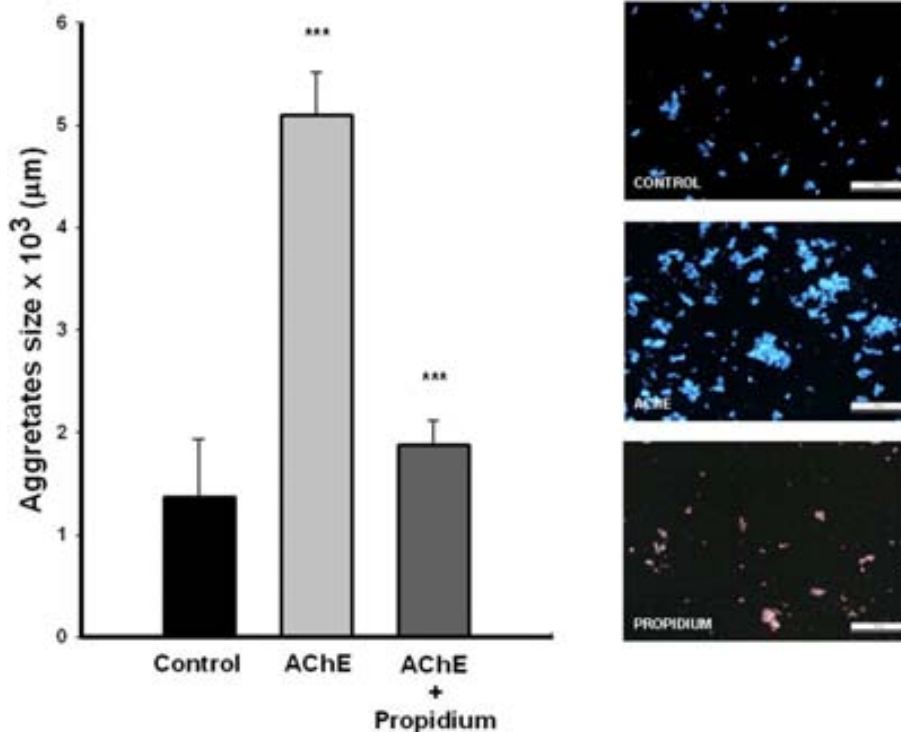


Fig. 3. Propidium iodide (100 µM) inhibition of PrP82-146 (1 mM) deposition induced by AChE (2.5 µM) after 48 h of incubation in 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, at room temperature. Results are expressed as means \pm SEM of MSA (μm^2) of at least three experiments run in triplicate. *** p <0.001. Bar 100 µm. Magnification 10 \times .

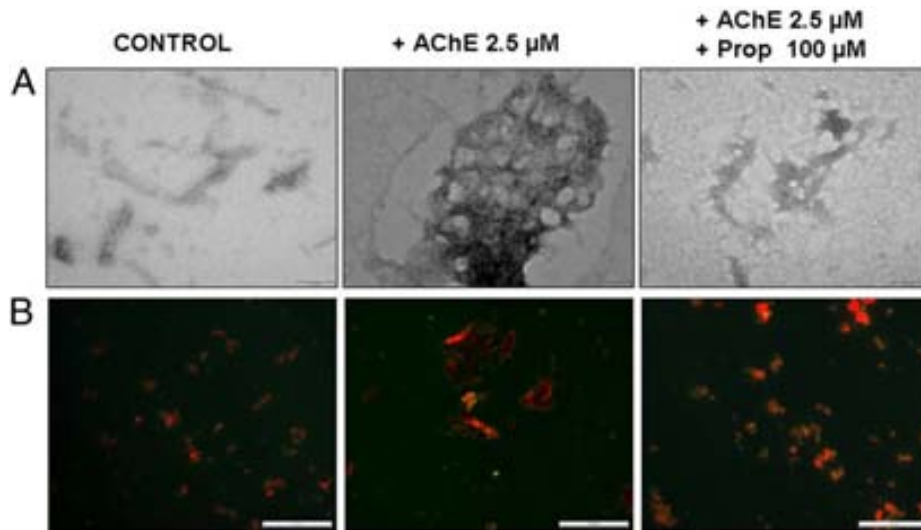


Fig. 4. (A) Electron micrographs of aggregates generated *in vitro* by PrP82-146 (1 mM), as revealed by negative staining of peptide suspensions: (1) controls, (2) AChE 2.5 μM, and (3) AChE and propidium iodide (100 μM) following 48 h of incubation. Magnification 70,000. Scale bar 100 nm. (B) Congo Red staining of PrP82-146 (1 mM) aggregates analyzed by polarized light microscopy: (1) controls, (2) AChE 2.5 μM, and (3) AChE and propidium iodide (100 μM) following 48 h of incubation. Magnification 40×. Scale bar 50 μm.

AFM Microscopy

PrP82-146 AFM images of samples incubated at three different times ($t=0$, 24 and 48 h) in the absence of AChE were initially taken as

control samples (see Fig. 5A). At incubation time $t=0$, small dots of proteins characteristic of a dewetting process with a small corrugation (≤ 1 nm) were detected. Such small islands randomly distributed over

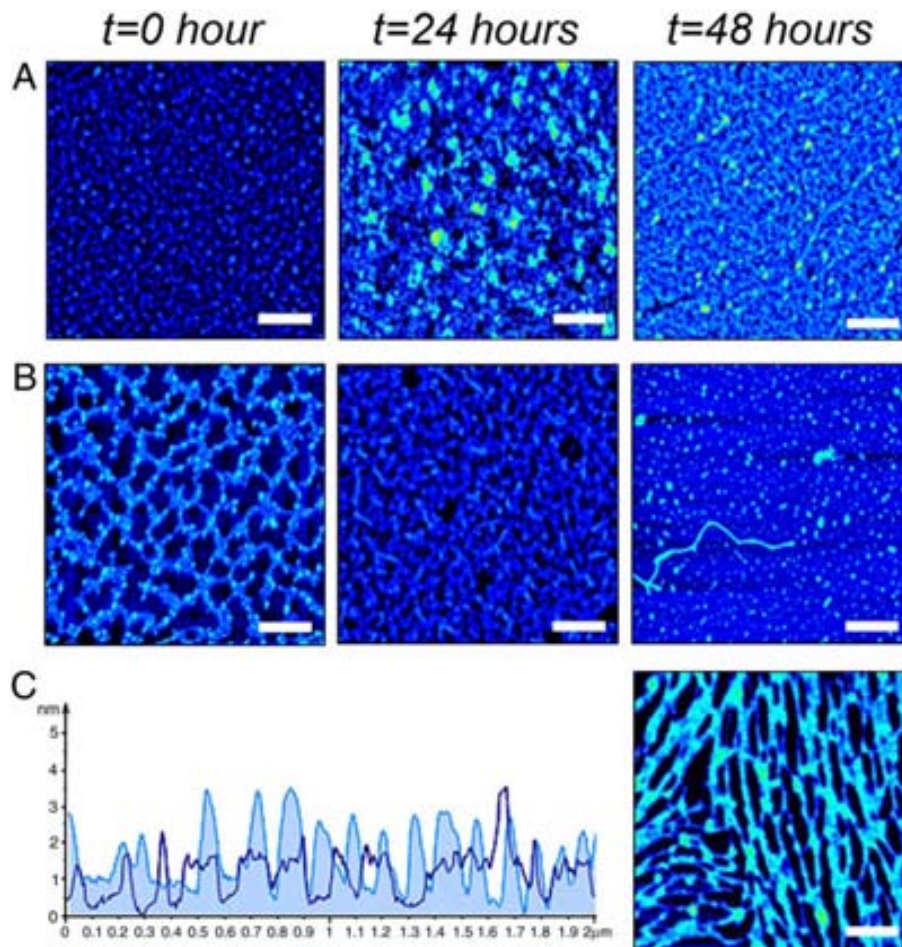


Fig. 5. AFM images of PrP82-146 (1 mM) incubated in the absence of AChE, control samples (a) and in the presence of AChE (2.5 μM) (b). Incubation of 48 h of PrP82-146 with AChE in the presence of Propidium iodide is shown in (c) as well as profile extraction of image B ($t=0$ h) blue line and C ($t=48$ h) shaded line. Scale bars are 400 nm for all images. Z-scale is the same for all images (8 nm).

the whole surface have been tentatively assigned to the observation of monomers and/or oligomers of the PrP82-146 protein, given their experimental height, exhibiting little tendency to aggregate. In addition, as can be seen in Fig. 5A, after 24 h of incubation, oligomers began to cluster, retaining their native-like morphology up to an average height of 2 nm. Such an aggregation process is also reflected by an overall increase of the mica surface coverage. After 48 h, further aggregation of the particles induces almost a complete surface coverage. Simultaneously, the formation of new seed-like dots (attributed to oligomer formation) at the top of the protein monolayer, which were apparently capable of merging in some cases into small fibril precursors, was also observed (see Fig. 5A).

The AFM images of the PrP82-146 aggregation process, when incubated in the presence of AChE, are shown in Fig. 5B. As can be seen there, the presence of AChE induces remarkable changes even at incubation time $t=0$. While in the absence of AChE small dots of proteins with a small corrugation (≤ 1 nm) appeared, the presence of AChE induces a distorted cross-linked honeycomb nanostructure with average heights of 2 nm and additional islands with heights up to 4 nm. After 24 h, the 2-nm-high inter-crossed motifs have increased almost to a complete surface coverage, retaining their native-like morphology (though with a slight size decrease). Interestingly, the formation of small fibrils in the upper part of the protein layer, a few hundred-nanometers long (end-to-end distance) and 1–2 nm high were observed. Finally, at 48 h of incubation full coverage of the mica surface took place and the number and length of the fibrils at the protein surface layer grew considerably. These fibrils exhibit similar heights to those found after 24 h, but are several times longer, up to a few μm in some cases (see Fig. 5B). Interestingly, the aggregation effect of AChE disappears when the experiments are carried out in the presence of propidium iodide (a peripheral site inhibitor of AChE). Indeed, after 48 h of incubation in the presence of both the AChE and the propidium iodide, the sample exhibits the characteristic cross-linked honeycomb pattern found for the sample at incubation time $t=0$, in the absence of propidium iodide (see Fig. 5C).

Discussion

AChE may have functions other than hydrolysis of ACh related to the peripheral anionic enzyme site (Cousin et al., 2005). These include promotion of neurite outgrowth, cell adhesion and enhancement of excitatory amino acid transmission. (Munoz et al., 1999; Bigbee et al., 2000; Soreq and Seidman, 2001). In addition, the presence of AChE in the amyloid plaques in Alzheimer patients has been demonstrated, and different reports corroborate the role of AChE in strengthening the amyloid- β peptides assembly (Alvarez et al., 1995; Alvarez et al., 1997; Bartolini et al., 2003; Inestrosa et al., 2008). Recently, we have demonstrated that AChE is also able to induce the aggregation of synthetic prion peptide PrP106-126, the hydrophobic segment involved in PrP protein aggregation in a similar way as has been previously described for A β protein (Pera et al., 2006). In the present study the AChE ability to strengthen the assembly and fibril formation of synthetic, prion peptide PrP82-146 has been analyzed. This peptide is the major component of amyloid fibrils of GSS disease and this synthetic homologous peptide shows suitable physicochemical properties and biological activity to be used for *in vitro* studies (Tagliavini et al., 2001). Results obtained herein demonstrate that the assembly of PrP82-146 and fibril formation is accelerated by the presence of AChE, and the peripheral site of the enzyme was involved in this effect since propidium iodide, a blocker of the peripheral site, reverted the amyloidogenic effect of AChE.

Transmissible spongiform encephalopathies (GSS, CJD, BSE) and AD share several pathological features, including neuronal degeneration, gliosis and extracellular deposition of insoluble β -pleated sheet

peptides. On the other hand, a decrease in the in CFS levels of AChE from patients with CJD has recently been demonstrated, suggesting an alteration in the cholinergic system also occurs in some prion diseases (Silveyra et al., 2006). In the present study, coumarin-PrP82-146 readily formed aggregate structures, since after 1 h of incubation the MSA values reached $749 \pm 45 \mu\text{m}^2$ in the kinetic studies; however, it was necessary to incubate the protein at for at least 2 days to obtain the peak MSA values ($1,232 \pm 152 \mu\text{m}^2$). Despite PrP82-146 and PrP106-126 containing the same hydrophobic amino-acid sequence involved in the β -sheet secondary-structure formation, the kinetic profile of aggregation differs since it has been described that coumarin-PrP106-126 already reached peak MSA values after 1 h of incubation (Pera et al., 2006). Accordingly, an analysis of short, synthetic peptides homologous to consecutive segments of PrP82-146 showed that the sequence spanning residues 106–126 has the highest propensity to adopt stable β -sheet structures and assemble into amyloid fibrils that are ultra-structurally similar to those observed in GSS patients (Salmona et al., 2003).

As in the case of A β and PrP106-126 (Inestrosa et al., 1996b; Bartolini et al., 2003; Pera et al., 2006), the rate of PrP82-146 aggregate formation was greater when the peptide was incubated with AChE. The peak MSA value in this experimental conditions was approximately 7-fold higher when compared with that obtained in the absence of the enzyme and, moreover, the peak MSA values of aggregates were substantially lower than those observed in PrP82-146 aggregation studies (Pera et al., 2006). In addition, the rate of amyloid formation was also dependent on the concentration of PrP82-146 (Fig. 2). Maximal increase in amyloid formation (maximal size of aggregates) was observed when the AChE:PrP82-146 ratio was increased in favor of AChE. These results are in accordance with the inductive effect of AChE on A β (1–40) amyloid formation observed by several authors (Inestrosa et al., 1996b; Bartolini et al., 2003). Consequently, taking into account these results and those previously described for AChE-A β protein interaction, they suggest that the acceleration effect of AChE on the aggregation process could be crucial, especially in the first steps of disease development in which the amount of amyloid protein is still low compared with AChE content. It has been observed that by using double transgenic mice which over-express both human amyloid precursor protein (APPswe) and human AChE, plaque onset in the hybrids occurred sooner than in the parental lines (APPswe transgenic mice; Rees et al., 2003). Therefore, AChE could act as a nucleating factor to promote amyloid formation in different diseases in which an amyloid protein was involved.

In the present study the structure of PrP82-146 and AChE-PrP82-146 aggregates was analyzed using polarized light and electronic microscopy. Macromolecular assemblies of both kinds of aggregates showed the tinctorial and optical properties of *in situ* amyloid, i.e., birefringence under polarized light after Congo Red staining. Birefringent properties of aggregates were more evident when AChE was present owing to the remarkable increase in the size of aggregates. The amyloid structure of the aggregates was also confirmed by electron microscope analysis. In the absence and in the presence of AChE, negative-stained PrP82-146 assemblies showed that aggregates are composed of unbranched fibrils, and no major morphological differences were detected among them. The amount of amyloid fibers found on the electron microscope grids was higher in the presence of the enzyme.

The role of the peripheral site of AChE accelerating the assembly of PrP82-146 was demonstrated using propidium iodide, a specific inhibitor of the peripheral site of AChE (Szegletes et al., 1999). It has been extensively demonstrated that propidium iodide inhibits the AChE-induced A β aggregation (Inestrosa et al., 1996b; Alvarez et al., 1997; Bartolini et al., 2003). When coumarin-PrP82-146 and AChE were co-incubated with propidium iodide (100 μM), an inhibition of 78% of MSA was obtained. This value was slightly lower than that

previously described for A β and PrP106–126 aggregation induced by AChE (Bartolini et al., 2003; Pera et al., 2006). Therefore, the fact that propidium iodide reverted the effect of AChE on PrP82–146 aggregation suggests that AChE induces PrP82–146 aggregation through the peripheral enzyme site. The inhibition of the AChE effect on PrP82–146 aggregation was also confirmed when aggregates were observed under polarized light and electronic microscopy. In both cases the size of aggregates was significantly decreased.

The insoluble character of amyloids and the difficulties to obtain crystalline materials severely limit the number of methodologies (NMR and XRD) that can give information of the structural features and aggregation phenomena of the proteins. Therefore, AFM has become a powerful, supporting analysis tool being increasingly employed to study the structure, misfolding and aggregation of proteins on surfaces. The amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates (Jansen et al., 2005) and the adsorption of human serum albumin and porcine pancreas trypsin on mica surfaces have recently been described using AFM analysis (Quist et al., 1995). In the present study, the AFM microscopy images confirm the aggregation process of PrP82–146 after different incubation times. Control images (for the samples incubated in the absence of AChE) showed the formation of small dots of protein (dimers/oligomers) exhibiting little tendency to aggregate at $t=0$. Similar behavior has already been described for monomers and dimers of native insulin lying flat on a mica surface (Jansen et al., 2005). Time-dependent AFM images obtained at 24 and 48 h exhibited an increasing degree of spontaneous amyloidogenesis, as was observed in the time-course fluorescence microscopy and in light and electron microscopy studies. In addition, the formation of new oligomers on the protein monolayer can be observed, suggesting the fibril precursor formation. Nevertheless, the presence of AChE induced a speeding-up of the aggregation process of PrP82–146, since a distorted, cross-linked honeycomb nanostructure with heights up to 4 nm was already observed at $t=0$. After 24 h of incubation, small fibrils can be detected whose length can reach up to a few μm . Moreover, these fibrils exhibit the characteristic traits of the mature amyloid fibrils, such as the tendency to bend or twist (Khurana et al., 2003). The presence of propidium iodide concomitantly with AChE inhibited the aggregation process induced by the enzyme, as was previously observed by fluorescence, light and electron microscopy studies. Moreover, protein monolayer and fibril formation were not observed in the presence of propidium iodide. Consequently, results obtained in the present work strongly suggest that AChE is able to promote synthetic PrP82–146 peptide aggregation through the peripheral enzyme site. Kinetic, light and electron microscopy studies, but especially results obtained from AFM, show that AChE acts as a nucleating factor increasing not only the formation of new oligomers, but also fibril formation. Therefore, inhibitors of the peripheral site of AChE could be relevant as potential anti-amyloidogenic drugs.

Experimental methods

Synthesis and purification of PrP peptides

PrP82–146

The peptide corresponding to PrP 82–146(GQPHGGGWGQGGG-THSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGMGYSAMSR-PIIHFGSDYE) was prepared by solid-phase synthesis on a 433A synthesizer (Applied Biosystems; Foster City, CA) purified by reverse phase-HPLC and verified by amino-acid sequencing (46600 Prosequencer, Milligen; Bedford, MA) and electrospray mass spectrometry (Model 5989A, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) as described previously (De Gioia et al., 1994; Tagliavini et al., 2000). Fluorescent PrP82–146 (coumarin-PrP82–146) and scrambled PrP82–146 were synthesized as described above, introducing a Lys-methylcoumarin residue introduced at position 101 and 92, respectively.

Prion Protein (PrP) aggregation studies

Time-course of AChE-induced PrP82–146 aggregation

The study was performed using lyophilized aliquots of PrP82–146, coumarin-PrP82–146 and their scrambled analogues. Peptides were dissolved at different concentrations in 100 mM Tris–HCl buffer, pH 7.0, added of bovine AChE (Sigma Aldrich) to obtain a final concentration of 2.5 μM in the same buffer (final volume assay 30 μl).

For time-course experiments of AChE-induced aggregation peptide samples were dissolved at the concentration of 1 mM, incubated at 37 °C for 1 h, 24 h, 72 h, 96 h and 144 h, and then samples were centrifuged at 13,000 $\times g$ for 10 min to separate the aggregates from soluble forms (Selvaggini et al., 1993). Peptide aliquots devoid of AChE were always used as control samples.

For experiments aimed at unveiling the effectiveness of AChE to trigger PrP82–146 aggregation, co-incubation experiments for 72 h at room temperature were carried out with different PrP82–146:AChE ratios, ranging from 1:50 to 1:400. At the end of the incubation period, samples were immediately deep-frozen and stored at –20 °C until analysis. Peptide aliquots devoid of AChE were always used as control samples.

Role of the peripheral site of AChE in the aggregation of the PrP peptide

To determine the role of the peripheral site of AChE in the aggregation process of PrP82–146, the effect of 100 μM propidium iodide (a specific blocker of the peripheral site of AChE) was concomitantly added with the enzyme and incubated during 72 h in the same conditions described above. Parallel control samples devoid of propidium iodide, or in the presence of the drug without AChE were always run. At the end of the incubation period, samples were immediately deep-frozen and stored at –20 °C until analysis.

Fluorescence microscopy

To quantify the influence of AChE on coumarin-PrP82–146 assembly, peptide pellets were washed several times with 100 mM Tris–HCl, pH 7.0, and suspended in 10 μl of the same buffer, placed on gelatin-coated slides and finally analyzed by fluorescence microscopy (Olympus BXJ1; DAPI filter). Three images of each replicate were selected (at least four experiments were run in triplicate) and the maximum size of aggregates (MSA, μm^2) of each image was determined using a standard-image analysis program (Leica Qwin) (Pera et al., 2006). This value was used to quantify the effects of the enzyme on the aggregation process of PrP82–146 in the different experimental conditions described above.

Polarized light and electron microscopy

For polarized light microscopy peptide pellets were washed several times with 100 mM Tris–HCl, pH 7.0, and suspended in 10 μl of the same buffer. The amyloid fibril-binding dye Congo Red was used to demonstrate the amyloid character of the PrP82–146 aggregates formed with or without AChE. Samples were air-dried on gelatin-coated slides and stained with 2% Congo Red in 80% ethanol saturated with NaCl and viewed under polarized light (Leitz DM RB; Oberkochen, Germany). For ultrastructural examination, 5 μl of suspension were applied to Formvar-carbon, 200-mesh nickel grids for 2 min, negatively stained with 2% (w/v) uranyl acetate, and observed using an electron microscope (Hitachi H-7000, Hitachi LTD; Tokyo, Japan).

Atomic Force Microscopy (AFM)

All AFM images were recorded on an Agilent 5500 AFM/SPM microscope. A multi-purpose low-coherence scanner of up to 10 μm was used for imaging at room temperature. Typically-used AFM probes were type FM silicon-point probes (constant force ~ 2 N/m, resonant frequency ~ 75 KHz) from Nanosensors. The scan rate was tuned proportionally to the area scanned and was kept in the 0.5–1.2 Hz range. The resolution of image acquisition was 512 pixels per

line. Flattened correction of AFM images, when needed, was made with MountainsMap software.

Untreated muscovite mica substrates (Scientec) of different sizes were used for deposition of the protein samples. Sample solutions as previously described, both without (control samples) and in the presence of the AChE enzyme, were diluted 1 to 10 times with ultra-pure water and 10 μ L of such solutions were added onto freshly cleaved mica at room temperature. After submitting the samples to a drying process, measurements were carried out under environmental conditions. AFM in a semi-contact mode was used affording both lateral and vertical resolution in a nanometric regime. Moreover, this AFM operation mode enables non-destructive imaging of soft surfaces or weakly attached samples. To exclude the interference of possible artifacts, extra control samples, such as freshly cleaved mica and freshly cleaved mica soaked with ultra pure-water, were also investigated. All the topographic patterns described in the text were confirmed by additional measurements in a minimum of three different, well separated areas.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM of MSA of at least 4 experiments run in triplicate. Variances of groups were compared using one-way ANOVA followed by Dunnett's test for multiple comparisons when appropriate. Differences were established at $p < 0.05$.

Acknowledgments

This work was supported by CIRIT 2005-SGR-00180, Vicerectorat de Recerca UAB PRP2006-05, Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) SAF2006-04339, MAT2006-13765-C02-01, the Institute Catalan of Nanotechnology and was partially supported by grants from the Italian Ministry of Health (533F/Q/1), Fondazione CARIPLO (GUARD), Negri-Weizmann Foundation to Dr. Mario Salmona. M.P. was supported by a MEC fellowship and A. M.-O. by a predocotoral grant of the Generalitat de Catalunya. The English of the manuscript has been revised and corrected by a native English speaking Instructor of Universitat Autònoma de Barcelona.

References

- Abid, K., Soto, C., 2006. The intriguing prion disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2342–2351.
- Abraham, C.R., Selkoe, D.J., Potter, H., 1988. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52, 487–501.
- Alvarez, A., Bronfman, F., Perez, C.A., Vicente, M., Garrido, J., Inestrosa, N.C., 1995. Acetylcholinesterase, a senile plaque component, affects the fibrillogenesis of amyloid-beta-peptides. *Neurosci. Lett.* 201, 49–52.
- Alvarez, A., Opazo, C., Alarcon, R., Garrido, J., Inestrosa, N.C., 1997. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* 272, 348–361.
- Armstrong, R.A., Lantos, P.L., Cairns, N.J., 2001. Spatial correlations between the vacuolation, prion protein deposits, and surviving neurons in the cerebral cortex in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology* 21, 266–271.
- Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Andrisano, V., 2003. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* 65, 407–416.
- Bigbee, J.W., Sharma, K.V., Chan, E.L., Bogler, O., 2000. Evidence for the direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 861, 354–362.
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., Caughey, W.S., 1991. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27–30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672–7680.
- Cohen, F.E., Prusiner, S.B., 1998. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 793–819.
- Cousin, X., Strahle, U., Chatonnet, A., 2005. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. *BioEssays* 27, 189–200.
- De Gioia, L., Selvaggini, C., Ghibaudi, E., Diomedea, L., Bugiani, O., Forloni, G., Tagliavini, F., Salmona, M., 1994. Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106–126 of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 269, 7859–7862.
- Dobson, C.M., 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24, 329–332.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1989. Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study. *Neuroscience* 33, 469–481.
- Geula, C., Greenberg, B.D., Mesulam, M.M., 1994. Cholinesterase activity in the plaques, tangles and angiopathy of Alzheimer's disease does not emanate from amyloid. *Brain Res.* 644, 327–330.
- Hainfellner, J.A., Wanschitz, J., Jellinger, K., Liberski, P.P., Gullotta, F., Budka, H., 1998. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.* 96, 116–122.
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Calderon, F., 1996a. Acetylcholinesterase is a senile plaque component that promotes assembly of amyloid beta-peptide into Alzheimer's filaments. *Mol. Psychiatry* 1, 359–361.
- Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., Garrido, J., 1996b. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 16, 881–891.
- Inestrosa, N.C., Dinamarca, M.C., Alvarez, A., 2008. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *FEBS J.* 275, 625–632.
- Jansen, R., Dzwolak, W., Winter, R., 2005. Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophys. J.* 88, 1344–1353.
- Jarrett, J.T., Lansbury Jr., P.T., 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055–1058.
- Khurana, R., Ionescu-Zanetti, C., Pope, M., Li, J., Nielson, L., Ramirez-Alvarado, M., Regan, L., Fink, A.L., Carter, S.A., 2003. A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys. J.* 85, 1135–1144.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-Ura, K., Tateishi, J., 1991. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* 65, 6292–6295.
- Kovacs, G.G., Budka, H., 2002. Aging, the brain and human prion disease. *Exp. Gerontol.* 37, 603–606.
- Miyazono, M., Kitamoto, T., Iwaki, T., Tateishi, J., 1992. Colocalization of prion protein and beta protein in the same amyloid plaques in patients with Gerstmann-Straussler syndrome. *Acta Neuropathol. (Berl)* 83, 333–339.
- Munoz, F.J., Aldunate, R., Inestrosa, N.C., 1999. Peripheral binding site is involved in the neurotrophic activity of acetylcholinesterase. *NeuroReport* 10, 3621–3625.
- Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., 1996. Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15457–15462.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, K., et al., 1991. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541, 163–166.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., et al., 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10962–10966.
- Pera, M., Roman, S., Ratiá, M., Camps, P., Munoz-Torrero, D., Colombo, L., Manzoni, C., Salmona, M., Badia, A., Clos, M.V., 2006. Acetylcholinesterase triggers the aggregation of PrP 106–126. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 89–94.
- Prusiner, S.B., 1998a. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13363–13383.
- Prusiner, S.B., 1998b. The prion diseases. *Brain Pathol.* 8, 499–513.
- Quist, A.P., Björck, L.P., Reimann, C.T., Oscarsson, S.O., Sundqvist, B.U.R., 1995. *Surf. Sci. Lett.* 325, L406–L412.
- Rees, T., Hammond, P.L., Soreq, H., Younkin, S., Brimijoin, S., 2003. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* 24, 777–787.
- Salmona, M., Morbin, M., Massignan, T., Colombo, L., Mazzoleni, G., Capobianco, R., Diomedea, L., Thaler, F., Mollica, L., Musco, G., Kourie, J.J., Bugiani, O., Sharma, D., Inouye, H., Kirschner, D.A., Forloni, G., Tagliavini, F., 2003. Structural properties of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease amyloid protein. *J. Biol. Chem.* 278, 48146–48153.
- 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, 1177–1182.
- Selvaggini, C., De Gioia, L., Cantu, L., Ghibaudi, E., Diomedea, L., Passerini, F., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., Salmona, M., 1993. Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106–126 of the prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1380–1386.
- Silveira, M.X., Garcia-Ayllon, M.S., Calero, M., Saez-Valero, J., 2006. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in the Creutzfeldt-Jakob cerebrospinal fluid. *J. Mol. Neurosci.* 30, 65–66.
- Small, D.H., Michaelson, S., Sberna, G., 1996. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 28, 453–483.
- Snow, A.D., Mar, H., Noehlin, D., Kimata, K., Kato, M., Suzuki, S., Hassell, J., Wight, T.N., 1988. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 133, 456–463.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302.
- Soto, C., 2001. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett.* 498, 204–207.
- Soto, C., 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 40–60.
- Supattapong, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H.O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Scott, M., 1999. Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* 96, 869–878.
- Szegletes, T., Mallender, W.D., Thomas, P.J., Rosenberry, T.L., 1999. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* 38, 122–133.

- Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T., De Gioia, L., Ragg, E., Bugiani, O., Salmona, M., 2000. Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP (Sc) in vitro. *J. Mol. Biol.* 300, 1309–1322.
- Tagliavini, F., Lievens, P.M., Tranchant, C., Warter, J.M., Mohr, M., Giaccone, G., Perini, F., Rossi, G., Salmona, M., Piccardo, P., Ghetti, B., Beavis, R.C., Bugiani, O., Frangione, B., Prelli, F., 2001. A 7-kDa prion protein (PrP) fragment, an integral component of the PrP region required for infectivity, is the major amyloid protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease A117V. *J. Biol. Chem.* 276, 6009–6015.
- Ulrich, J., Meier-Ruge, W., Probst, A., Meier, E., Ipsen, S., 1990. Senile plaques: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 80, 624–628.