



La Pentraxina Neuronal 1 i la toxicitat sinàptica en la malaltia d'Alzheimer

Tesi presentada per M^aAlba Abad Fernàndez
per a optar al títol de Doctora en Biologia

ÍNDEX	I
AGRAÏMENTS	IX
ABREVIATURES	XIII
INTRODUCCIÓ	1
1.- El programa de mort en els trastorns neurodegeneratius	3
1.1.- La mort cel·lular programada en el sistema nerviós	3
1.1.1.- Mort cel·lular programada	4
1.1.1.1.- Classificació de la mort cel·lular programada segons la morfologia cel·lular	5
1.1.1.2.- Classificació de la mort cel·lular programada segons el mecanisme intracel·lular que actua	7
1.1.1.2.1.- Les caspases	8
1.1.1.2.2.- Vies bioquímiques de la mort cel·lular programada dependent de caspases	10
1.1.1.2.2.1.- Via extrínseca	10
1.1.1.2.2.2.- Via intrínseca	11
1.1.1.2.2.2.1.- Família Bcl-2	12
1.1.1.2.2.3.- Bid: punt de trobada	12
1.1.1.2.3.- Vies bioquímiques de la mort cel·lular programada independent de caspases	13
1.1.2.- Mort programada en els trastorns neurodegeneratius	14
1.1.2.1.- Trastorns neurodegeneratius: definició	14
1.1.2.2.- Classificació de les malalties neurodegeneratives	15
1.1.2.3.- Quines són les causes de les malalties neurodegeneratives?	16
1.1.2.4.- Quin és el paper de la mort cel·lular programada en els trastorns neurodegeneratius?	16
1.1.2.4.1.- Mort cel·lular programada en la malaltia d'Alzheimer	18

1.1.2.4.2.- Mort cel·lular programada en la malaltia de Parkinson	19
1.1.2.4.3.- Mort cel·lular induïda per repeticions de poliglutamines	20
1.1.2.4.4.- Mort programada en l'esclerosi lateral amiotròfica.....	21
2.- La pentraxina neuronal 1 i el programa de mort cel·lular en neurones	22
2.1.- NP1 en el programa de mort induït per reducció d'activitat	22
2.1.1.- NP1 i l'expressió gènica durant el procés de mort	23
2.1.2.- NP1 i tractaments neuroprotectors	24
2.2.- NP1 en el dany per hipòxia-isquèmia	25
3.- Trajectes de senyalització de vida i mort i regulació de l'expressió de NP1	27
3.1.- Neurotrofines	28
3.1.1.- Receptors de les neurotrofines	29
3.1.1.1.- Transducció de senyals a través dels receptors Trk	29
3.1.1.2.- Senyalització a través del receptor p75 ^{NTR}	30
3.2.- MAPK	31
3.2.1.- ERK	31
3.2.2.- JNK	32
3.2.3.- p38	34
3.3.- GSK-3	34
3.3.1.- Regulació de GSK-3	35
3.3.2.- Què regula GSK-3?	38
3.4.- Paper de les vies de senyalització intracel·lular en la regulació de NP1	39
4.- La família de les pentraxines	41
4.1.- Les pentraxines curtes	42
4.2.- Les pentraxines llargues	43

4.2.1.- TSG-14/PTX3	43
4.2.2.- Apexina/p50	44
4.2.3.- XL-PXN1	44
4.2.4.- NP1	44
4.2.5.- NP2	46
4.2.6.- Receptor de les pentraxines neuronals (NPR)	49
4.2.6.1.- Pentraxina neuronal amb domini chromo (NPCD)	51
4.3.- Relació entre les pentraxines neuronals NP1 i NP2	53
5.- La mort neuronal programada i els mecanismes de neurodegeneració en la malaltia d'Alzheimer	56
5.1.- Característiques neuropatològiques de la malaltia d'Alzheimer	56
5.1.1.- Les plaques neurítiques	56
5.1.2.- Els cabdells neurofibril·lars	56
5.2.- A β vs Tau	57
5.2.1.- Hipòtesi Tau	57
5.2.2.- Hipòtesi Amiloidea	58
5.3.- Factors genètics que predisposen a la AD	60
5.3.1.- Processament de l'APP i mutacions	60
5.3.2.- Mutacions en les Presenilines: PS1 i PS2	62
5.3.3.- L'al·lel ϵ 4 de l'Apolipoproteïna E	63
5.4.- A β soluble	64
5.5.- Funció d'A β ?	65
5.6.- Programa de mort en la malaltia d'Alzheimer	66
OBJECTIUS	69
MATERIAL I MÈTODES	73
1.- Cultiu de cèl·lules corticals	75

2.- Tractament dels cultius corticals amb el pèptid β-amiloid	77
2.1.- Preparació dels pèptids d'A β	77
2.2.- Tractament dels cultius primaris de cèl·lules corticals amb A β	78
3.- Mesura de la viabilitat cel·lular i l'apoptosi en els cultius corticals	78
4.- Estudi del creixement neurític en els cultius corticals tractats amb Aβ	80
5.- Immunofluorescència dels cultius corticals	81
6.- Vectors lentivirals	82
6.1.- Obtenció del vector pWPI-NP1	84
6.1.1.- Digestió del vector pWPI	84
6.1.2.- Inert d'NP1 amb extrems roms	84
6.1.3.- Lligació i transformació en DH5 α	84
6.1.4.- Cultiu líquid, Miniprep i comprovació de colònies de la lligació per digestió amb l'enzim de restricció Not I	85
6.2.- Obtenció del vector pLVTHM-shARNi	87
6.2.1.- Anellament i lligació dels shARNi amb el vector pSuper.retro	88
6.2.2.- Digestió EcoRI i ClaI	88
6.2.3.- Lligació dels shARNi amb el vector pLVTHM	89
6.3.- Producció de virus	89
6.4.- Titulació dels lentivirus	90
7.- Transducció de les cèl·lules corticals amb els lentivirus	91
8.- Síntesi d'oligodeoxiribonucleòtids i tractament dels cultius corticals	91
9.- Assaig de <i>western blot</i> de les proteïnes extretes a partir dels cultius primaris de neurones corticals	92
9.1.- Extracció de proteïnes	92
9.2.- Preparació del gel d'acrilamida	93

9.3.- Electroforesi de les mostres	94
9.4.- Transferència a membranes de PVDF (<i>polyvinylidene difluoride</i>)	94
9.5.- Immunodetecció	95
10.- Comprovació de l'especificitat dels anticossos contra NP1 i NP2	96
11.- Expressió i purificació de la proteïna GST-NP1	98
12.- Processat dels talls de cervells humans	98
12.1.- Immunohistoquímica de NP1	100
12.2.- Immunofluorescència de NP1 i microscopia confocal	101
13.- Assaig de <i>western blot</i> de les proteïnes extretes a partir dels cervells humans.....	102
14.- Ratolins transgènics per la proteïna precursora amiloidea mutant i presenilina 1 (APP/PS1)	103
15.- Mesura de la concentració intracel·lular de calci en les cèl·lules corticals transduïdes	103
RESULTATS	105
1.- Aβ activa el programa de mort neuronal apoptòtica en cèl·lules corticals en cultiu	107
2.- Aβ incrementa l'expressió de NP1 abans d'induir mort neuronal	111
3.- El silenciament de la sobreexpressió de NP1 rescata a les neurones corticals de la mort apoptòtica induïda per Aβ	114
4.- La NP1 és necessària per la reducció del creixement neurític induït per Aβ1-42.....	116
5.- El silenciament de l'expressió de NP1 bloqueja la pèrdua sinàptica induïda per Aβ	121
6.- La sobreexpressió del transgen de NP1 reproduïx els efectes neurotòxics d'Aβ pel que fa al dany neurític i l'apoptosi	122
7.- Anàlisi dels nivells de NP1 en homogenats de cervells humans	125
8.- Localització de la immunoreactivitat de NP1 en cervells de malalts d'Alzheimer i de ratolins transgènics APP/PS1	126

9.- El silenciament de NP1 incrementa el nombre de sinapsis en les neurones corticals	130
10.- Les neurones corticals amb la NP1 silenciada són més excitables	133
DISCUSSIÓ	137
1.- Malaltia d'Alzheimer i oligòmers d'Aβ	139
2.- La regulació de l'expressió de NP1 contribueix a la neurotoxicitat induïda per Aβ	140
3.- Principals hipòtesi sobre els efectes dels oligòmers d'Aβ	142
4.- Possibles mecanismes d'acció de l'Aβ i l'expressió de NP1	146
5.- Funció de la NP1	147
CONCLUSIONS	153
ANNEX	157
BIBLIOGRAFIA	181

**GRÀCIES A TOTS ELS QUE HEU ESTAT AL MEU COSTAT DURANT TOT
AQUEST TEMPS I QUE D'UNA O ALTRA MANERA HEU FET POSSIBLE
AQUEST TREBALL!!!!**

**Cuca Marta
Lourdes Sergio Ruben
Marga Ferran
Maria David
Zipi Nuria Helena Pepe Oscar
Miriam Rosa Taia Jordi
Mer Xavi Juanma Iai
Erika Ivan Ramón Guri Agnès
Nan Lambert Gemma Mario Xavi
Anna Tamara Kevin Olga Dani
Jose Tillo Silvia Bea David
Maria Sònia Emili Samu
Vanessa Laura Mami Laura Acho
Jesús Mercè Ivan Teresa Araní Mireia
Iaia Vanessa Anna Tililla
Maria Angels Petar Lluís Aroha Lidia
Raquel Xavi Laia Avi
Pili Inés
Chy**

“Em pregunto si les estrelles estan il·luminades perquè cadascú algun dia pugui trobar la seva...”. Antoine de Saint-Exupéry

Gràcies!

Gracias!

Thanks!

Aβ	β -amiloid
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADDLs	<i>Aβ-derived diffusible ligands</i>
AIF	Factor inductor d'apoptosi (<i>Apoptosis inducing factor</i>)
AKT	<i>AKR mouse thymoma</i>
ALS	Esclerosi lateral amiotròfica
AMPA	a-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionat
AMPARs	Receptors de glutamat del tiopus AMPA
AP-1	<i>Activating protein-1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ApoE	Apolipoproteïna E
APP	Proteïna precursora amiloïda (<i>Amyloid precursor protein</i>)
ARN	Àcid ribonucleic
ATP	Adenosintrifosfat
BACE	<i>β-amyloid cleaving enzyme</i>
Bad	<i>Bcl-2 associated death agonist</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BH	dominis d'homologia amb Bcl-2 (<i>conserved Bcl-2 homology domains</i>)
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>

Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
CARD	domini d'activació i reclutament de caspases (<i>caspase activation and recruitment domain</i>)
CREB	<i>Cyclic AMP response element binding protein</i>
CRP	Proteïna-C reactiva (<i>C-reactive protein</i>)
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DD	domini de mort (<i>death domain</i>)
DED	domini efector de mort (<i>death-effector domain</i>)
DR3	<i>death receptor 3</i>
DR4	<i>death receptor 4</i>
DR5	<i>death receptor 5</i>
Dsh	<i>Dishevelled</i>
ERK	<i>Extracellular signal-kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
Gab-1	<i>Grb-associated binder-1</i>
GS	<i>glycogen synthase</i>
GSK-3	Glicogen sintasa cinasa-3 (<i>glycogen synthase kinase-3</i>)
GST	Glutatió-S-transferasa
HI	Hipòxia-Isquèmia
IAP	Proteïna inhibidora de l'apoptosi (<i>inhibitor of apoptosis</i>)
IGF-1	Factor de creixement similar a la insulina-1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>)
IL-1	Interleucina-1
IL-18	Interleucina-18
IP	Iodur de propidi

IP3	<i>Inositol 1,4,5-trifosfat</i>
IRS	<i>Insulin receptor substrates</i>
JIP	<i>JNK interacting proteins</i>
JNK	Cinasa de la regió N-terminal de Jun (<i>c-jun N-terminal kinase</i>)
LPS	Lipopolisacàrid bacterià
LTP	<i>Long term potentiation</i>
MAP	<i>Proteïna associada a microtúbuls (Microtubule associated protein)</i>
MAPK	Cinasa activada per mitògens (<i>mitogen activated protein kinase</i>)
MKK	Cinasa de MAPK (<i>MAPK-kinase</i>)
MKKK	Cinasa de cinasa de MAPK (<i>MAPK-kinase kinase</i>)
MLK	<i>mixed-lineage protein kinases</i>
MEF	Fibroblasts embrionaris de ratolí (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
NGF	Factor de creixement neuronal (<i>nerve growth factor</i>)
NFκB	Factor nuclear κB (<i>nuclear factor κB</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMDARs	Receptors de glutamat del tipus NMDA
NP1	Pentraxina Neuronal 1 (<i>Neuronal Pentraxin 1</i>)
NP2/NARP	Pentraxina Neuronal 2 (<i>Neuronal Pentraxin 2/Neuronal activity-related protein</i>)
NPCD	Pentraxina neuronal amb domini cromo
NT-3	Neurotrofina-3

NT-4/5	Neurotrofina-4/5
ODN	Oligodeoxinucleòtid
PARP	poli-(ADP-ribosa) polimerasa
PCD	Mort cel·lular programada (<i>Programmed cell death</i>)
PF	Protofibril·les d'A β
PHF	<i>Paired helical filaments</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-cinasa (<i>phosphoinositide 3'-kinase</i>)
PIP2	<i>Fosfatidilinositol-3,4- bifosfat</i>
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PLC-γ	<i>Fosfolipasa C-gamma</i>
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
PSD95	Post-synaptic density protein-95
PTPRO	<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type O</i>
PTX3	Pentraxina 3
RPTPs	Tirosina-fosfatases de tipus receptor de membrana (<i>transmembrane receptor-type tyrosine phosphatases</i>)
SAP	Proteïna amiloidea-P del sèrum (<i>serum amyloid P component</i>)
SAPK	Cinases activades per estrès (<i>stress-activated MAP kinases</i>)
SMAC/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI</i>
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein of 25kDa</i>
SNPC	<i>substantia nigra pars compacta</i>

SOD-1	Superòxid dismutasa 1
TCBP49	<i>Taipoxin- associated calcium-binding protein 49</i>
TNF	factor de necrosi tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TNFR1	receptor de TNF (<i>TNF receptor 1</i>)
Trk	<i>tropomyosin receptor kinase</i>
TSG-14	<i>TNF-stimulated gene 14</i>
TTX	Tetradotoxina
TUNEL	<i>terminal transferase-mediated (TdT) deoxyuridine triphosphate (d-UTP)-biotin nick end labeling</i>

1.- EL PROGRAMA DE MORT EN ELS TRASTORNS NEURODEGENERATIUS

1.1.- La mort cel·lular programada en el sistema nerviós

Durant el desenvolupament embrionari es moren les neurones que es produeixen en excés. Fins a un 50% o més dels diversos tipus de neurones es moren abans o poc després d'haver establert les connexions sinàptiques i hom creu que aquesta mort reflexa el fracàs d'aquestes neurones en obtenir els factors neurotròfics que produeixen les cèl·lules diana i que són necessaris per la seva supervivència (Raff et al., 1993). La hipòtesi neurotròfica ha proporcionat un dels marcs conceptuals per explicar els mecanismes d'aquesta mort neuronal massiva durant el desenvolupament (Oppenheim, 1991).

Els treballs pioners d'en Viktor Hamburger i Rita Levi-Montalcini varen establir que la supervivència de les neurones en les etapes del desenvolupament està directament lligada a la disponibilitat de les cèl·lules amb les que han de realitzar connexions sinàptiques. La hipòtesi neurotròfica proposa que les neurones immadures competeixen pels factors tròfics secretats per les cèl·lules diana que innerven, d'aquesta manera, només les cèl·lules capaces d'establir les connexions sinàptiques correctes obtindran l'aportació tròfica suficient que permeti la seva supervivència [(Cohen et al., 1954;Hamburger, 1992;Hamburger and Levi-Montalcini, 1949;Levi-Montalcini, 1987)]. Així, la hipòtesi neurotròfica prediu que la supervivència neuronal requereix d'una senyal positiva. Però no proporciona cap mecanisme que permeti explicar perquè moren les cèl·lules en absència de factor tròfic, més aviat assumeix que les neurones moren per inanició.

No va ser fins molt més tard que es va vincular la mort per deficiència de factor tròfic amb la mort cel·lular programada que succeeix en tots els tipus cel·lulars. En el 1988, utilitzant cultius de neurones simpàtiques, el grup d'en Eugene Johnson va descobrir que la mort per deficiència de factor tròfic depenia de la síntesi *de novo* de proteïnes (Martin et al., 1988). En aquests estudis van observar que si s'inhibia la síntesi d'ARN i

proteïnes es bloquejava la mort neuronal de les neurones simpàtiques induïda per privació de factor de creixement neuronal (NGF).

- **1.1.1.- Mort cel·lular programada**

Al llarg de tota la vida perdem milers de cèl·lules dels teixits i òrgans del nostre cos. Aquesta pèrdua de cèl·lules es dona a través d'un procés altament regulat que es coneix com a mort cel·lular programada (*programmed cell death*, PCD), un tipus de mort que, juntament amb la generació de noves cèl·lules, manté el tamany i la funció dels òrgans i teixits [revisat a (Buss et al., 2006)]. En el sistema nerviós, però, aquest mecanisme de renovació cel·lular no és tant pronunciat. Amb l'excepció dels casos on hi ha dany del sistema nerviós, com en la isquèmia, o patologia, com en les malalties neurodegeneratives, la majoria de les cèl·lules nervioses amb les que naixem són les mateixes amb les que morim (Peters and Rosene, 2003). Per altra banda, tot i que si no hi ha cap accident les neurones madures no es moren una vegada diferenciades, ara ja se sap que el que si persisteix en el cervell adult es la generació de noves neurones. La neurogènesi es pot regular per una multitud d'estímuls externs tals com l'aprenentatge, la memòria, l'exercici, l'ambient i l'estrès (Zhao et al., 2008). Tot i que les neurones que es generen de nou són capaces d'incorporar-se en la xarxa neuronal en diverses àrees cerebrals, encara no se sap amb certesa si compleixen una funció específica o si el seu nombre es regula també per PCD (Zhang et al., 2008).

La PCD fa referència a la mort que es produeix com a conseqüència de l'activació i execució de senyals específics interns. Tot i la tendència general a utilitzar el terme PCD de manera equivalent al d'apoptosi, el procés de mort programada no està associat a una aparença morfològica determinada. La PCD es defineix com un procés de mort actiu, genèticament programat i regulat pels gens pro i anti-apoptòtics [revisat a (Buss et al., 2006)]. Aquest procés de mort és fonamental en el desenvolupament i la formació dels òrgans de tots els organismes pluricel·lulars i s'ha conservat al llarg de l'evolució (Vila and Przedborski, 2003).

Els intermediaris moleculars que formen part del programa de mort cel·lular es van trobar, per primer cop, en *C.elegans* pel grup de Horvitz [(Ellis and Horvitz, 1986), revisat a (Meier et al., 2000)]. Estudis realitzats en mutants que tenien alterat el procés

de mort van permetre identificar els gens implicats en la regulació, execució i resolució del programa de mort (Ellis et al., 1991). Quatre d'aquests gens són essencials perquè es dugui a terme el procés en tots els tipus cel·lulars: *egl-1*, *ced-3*, *ced-4* (tots ells inductors de mort), i *ced-9* (inhibidor del procés de mort). CED-3 provoca mort cel·lular quan s'uneix a la molècula adaptadora CED-4. CED-4 només pot unir-se a CED-3 quan no es troba associada a la proteïna supressora de mort CED-9. Quan CED-4 es dissocia de CED-9 per l'acció d'EGL-1, CED-4 pot unir-se a CED-3 per activar-la i induir, d'aquesta manera, la mort de la cèl·lula (Meier et al., 2000).

Aquesta maquinària bàsica de mort s'ha conservat al llarg de l'evolució dels metazous. Els equivalents en mamífers d'aquestes quatre proteïnes clau del programa de mort en *C.elegans* són les caspases per CED-3, Apaf-1 per CED-4, els membres anti-apoptòtics de la família de proteïnes Bcl-2 per CED-9, i els pro-apoptòtics de la família Bcl-2 per EGL-1 (Meier et al., 2000).

- 1.1.1.1.- Classificació de la mort cel·lular programada segons la morfologia cel·lular

Segons els tipus de cèl·lula i segons l'entorn en que succeeix el programa de mort cel·lular, la cèl·lula pot manifestar diverses morfologies.

En un estudi clàssic sobre el procés de mort cel·lular programada que es produeix durant el desenvolupament, Schweichel i Merker (Schweichel and Merker, 1973) van classificar el procés de mort programada en tres subtipus segons la morfologia que presenten les cèl·lules [revisat a (Yuan et al., 2003) i (Bredesen et al., 2006)]. El subtipus I, més conegut com a mort nuclear o apoptòtica, el subtipus II, anomenat mort per autofàgia, i el subtipus III també coneguda com a mort citoplasmàtica (Bredesen et al., 2006). Aquests tres tipus de PCD s'observen en determinades etapes del desenvolupament del sistema nerviós i també en resposta a diferents estímuls tòxics com serien el dany en l'ADN o com a resultat de l'acumulació de proteïnes amb estructura anormal en algunes malalties neurodegeneratives (Bredesen et al., 2006). Però, cal dir que només el subtipus I i el II s'accepten de manera indiscutible per la comunitat científica com a formes de mort cel·lular programada.

El primer subtipus és la mort nuclear o apoptòtica. Aquesta es caracteritza per una reducció del volum cel·lular, condensació nuclear, fragmentació de l'ADN (Fadok et al., 1992), formació de protuberàncies en la membrana plasmàtica i desestabilització del citoesquelet. Com a conseqüència de tots aquests canvis, es formen els anomenats cossos apoptòtics, envoltats de membrana, que són fagocitats per macròfags sense que es desencadeni una resposta inflamatòria (Yuan and Yankner, 2000). La fosfatidilserina, que es troba localitzada a la cara citoplasmàtica de la membrana cel·lular en les cèl·lules vives, en el procés d'apoptosi es transloca cap a la cara extracel·lular (Fadok et al., 1992). Més endavant, es va demostrar que aquests canvis morfològics i histoquímics són, en gran part, el resultat de l'activació de les caspases (Thornberry and Lazebnik, 1998) i (Yuan et al., 1993).

El segon subtipus de mort cel·lular programada que es va definir és la mort per autofàgia (Bredesen et al., 2006). La principal característica que presenten les cèl·lules és l'aparició, en el citoplasma, de nombroses vacuoles d'origen lisosomal. El que ha de ser degradat és rodejat per l'autofagosoma, una estructura delimitada per una membrana, que acaba fusionant-se amb un lisosoma i es degrada tot el seu contingut. Les mitocòndries, l'aparell de Golgi i el reticle endoplasmàtic es dilaten. En determinades ocasions es poden observar nuclis picnòtics o protuberàncies en la membrana citoplasmàtica en estadis posteriors en la mort autofàgica, però no és freqüent. El procés d'autofàgia pot tenir lloc en diferents organismes i es subdivideix en macro-autofàgia, micro-autofàgia i autofàgia mitjançada per xaperones. Aquest procés complementa la via de degradació pel proteasoma mitjançant la qual s'eliminen de forma molt regulada proteïnes 'velles', agregats proteics i d'altres orgànuls [revisat a (Bredesen et al., 2006)].

El tercer subtipus de mort cel·lular programada és la mort citoplasmàtica. Aquest subtipus de PCD no ha estat estudiat amb tant detall com l'apoptosi i s'assembla a la mort per necrosi ja que es caracteritza per l'aparició d'orgànuls inflats, com el reticle endoplasmàtic i les mitocòndries, i no presenta ni nuclis apoptòtics ni fragmentació nuclear (Bredesen et al., 2006).

En alguns casos, però, la morfologia observada en el procés de mort programada no s'adiu a cap dels tres subtipus anomenats anteriorment i s'han descrit altres formes de mort cel·lular que depèn de la síntesi *de novo* de proteïnes (Bredesen et al., 2006). El grup de Driscoll va descriure en *C. elegans* un tipus de PCD no apoptòtica i

independent de caspases que no s'ajusta a les característiques morfològiques de cap dels 3 subtipus. Aquesta es caracteritza per l'aparició d'unes invaginacions en la membrana i està mediada per l'entrada de calci [(Syntichaki et al., 2002) i revisat a (Bredesen et al., 2006)]. Una cinquena forma de PCD va ser descrita per Dawson i col·laboradors i es tracta d'una mort no-apoptòtica que depèn de l'activació de la PARP (poli-(ADP-ribosa) polimerasa) i la conseqüent translocació del factor inductor d'apoptosi (AIF) de la mitocòndria al nucli. Aquest subtipus de PCD s'activa per agents que indueixen dany a l'ADN (Yu et al., 2002).

- 1.1.1.2.- Classificació de la mort cel·lular programada segons el mecanisme intracel·lular que actua

La mort neuronal programada pot transcórrer a través de diferents vies bioquímiques. Fins fa poc es pensava que l'activació de les caspases era necessària per l'execució del programa de mort cel·lular, però en estudis recents s'ha trobat evidència de l'existència de PCD independent de caspases en mamífers [(Cheng et al., 2001) i revisat a (Abraham and Shaham, 2004; Kroemer and Martin, 2005)]. Així, la mort cel·lular programada es pot executar a través de dos processos diferenciats, els que depenen de caspases i els que no (Kroemer and Martin, 2005).

Dins dels programes de mort que depenen de caspases trobem la via extrínseca, que s'origina per l'activació de receptors de mort que es troben a la superfície cel·lular i resulta en l'activació de la caspasa-8 o -10, i la via intrínseca, que produeix l'alliberació de citocrom c de la mitocòndria i la conseqüent activació de la caspasa-9 [revisat a (Bredesen et al., 2006) i (Kroemer and Martin, 2005)]. En la majoria dels casos, aquestes dues vies actuen de manera independent. No obstant, en alguns casos es produeix una interacció entre la via extrínseca i la via intrínseca a través de la proteïna Bid [revisat a (Hengartner, 2000)] (Figura 1).

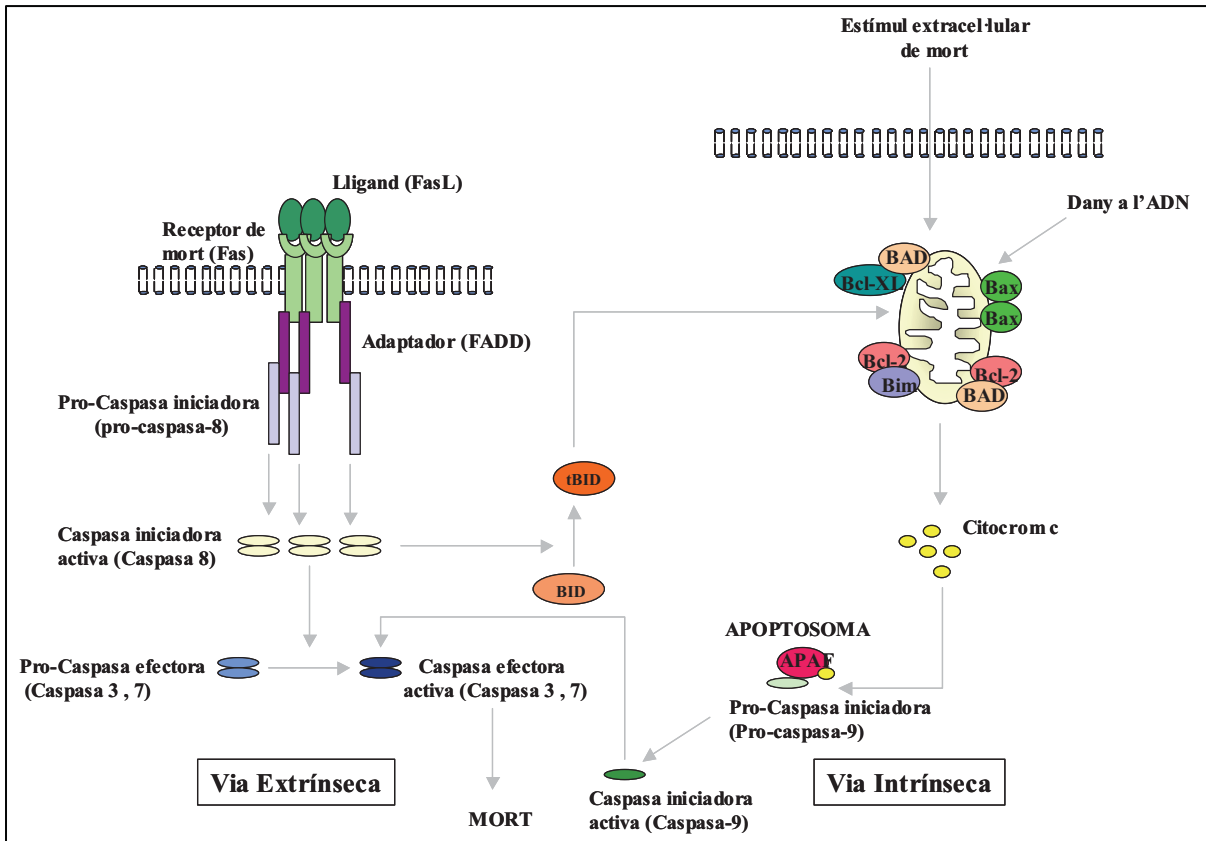


Figura 1. Via intrínseca i extrínseca del programa de mort.

- 1.1.1.2.1.- Les caspases

Les caspases són una família de proteases altament conservades al llarg de l'evolució. En humans s'han identificat una dotzena de caspases, aproximadament vuit de les quals han estat implicades en l'apoptosi (Earnshaw et al., 1999); (Thornberry and Lazebnik, 1998). Estudis bioquímics i genètics realitzats en ratolins mutants per caspases indiquen que estan organitzades en vies paral·leles, freqüentment superposades, especialitzades en la resposta a diferents estímuls. Alguns membres de la família, com la caspasa 1 i 11, tenen un paper en la resposta inflamatòria perquè processen citocines pro-inflamatòries com la interleucina 1 (IL-1) i la interleucina 18 (IL-18). Altres membres, com les caspases 3 i 7, participen més directament en l'execució del procés de mort cel·lular. L'activitat d'aquestes últimes dona lloc als canvis morfològics que s'observen durant el procés de mort, incloent la degradació de l'ADN, la condensació de la cromatina, i la formació de protuberàncies a la membrana citoplasmàtica (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Les caspases són cisteïna proteases que hidrolitzen els seus substrats després d'un residu d'aspartat, essent els quatre aminoàcids situats a l'extrem amino-terminal (N-terminal) d'aquest residu els que determinen l'especificitat de l'enzim (Thornberry et al., 1997). Les caspases són sintetitzades com zimògens inactius que contenen tres dominis principals: un pro-domini en la regió N-terminal, una subunitat gran (p20), i una subunitat petita (p10). Les caspases amb pro-dominis llargs estan implicades en l'inici de la mort cel·lular, raó per la que reben el nom de caspases iniciadores (8, 10, 1, 2, 4, 5, 9) i s'activen per interaccions proteïna-proteïna. Les caspases amb pro-dominis curts (3, 6, 7) són activades proteolíticament per les caspases iniciadores i reben el nom de caspases efectores [revisat a (Hengartner, 2000)].

Cadascuna de les caspases iniciadores contenen dominis d'interacció proteïna-proteïna que els permeten unir-se amb els reguladors que es troben per sobre d'elles en la via de mort. Així, les caspases 8 i 10 tenen el domini efector de mort (DED, *death-effector domain*) mentre que la caspasa 2 i la 9 contenen un domini d'activació i reclutament de caspases anomenat CARD (*caspase activation and recruitment domain*) [revisat a (Green, 1998) i (Hengartner, 2000)].

Aquests dos dominis comparteixen poca homologia en la seva seqüència, però tenen una estructura tridimensional molt similar, sis hèlix α antiparal·leles (Hofmann, 1999). Aquesta estructura també es troba en el domini de mort (DD, *death domain*) dels receptors de mort, com CD95, Fas o p75NTR, i en algunes molècules adaptadores com FADD (*Fas-associated death domain*) (Hofmann, 1999) i (Huang et al., 1996).

Les caspases són les executores de l'apoptosi i també promouen la mort autofàgica però hi ha diversos casos on l'activació de les caspases no dóna lloc a l'execució del programa de mort (Abraham and Shaham, 2004). Per exemple, en els glòbuls vermells i les cèl·lules del cristal·lí quan es diferencien, l'activació de les caspases indueix una sèrie de canvis morfològics semblants als observats en l'apoptosi però que no causen mort cel·lular. D'altra banda, també existeixen diferents caspases, com la caspasa-1 i la caspasa-11, que tenen funcions dins el sistema immunitari i són l'exemple més clar de caspases que no indueixen canvis apoptòtics ni execució del programa de mort (Abraham and Shaham, 2004).

- 1.1.1.2.2.- *Vies bioquímiques de la mort cel·lular programada dependent de caspases*

- 1.1.1.2.2.1.- Via extrínseca

Els receptors de mort són proteïnes de membrana que detecten senyals extracel·lulars de mort. Aquesta família de receptors està formada per diferents membres, entre els quals Fas (CD95/APO1) i el receptor de TNF1 (TNFR1, *TNF receptor 1*) són els millor estudiats. No obstant, existeixen altres receptors de mort com el DR3 (*death receptor 3*), DR4 (*death receptor 4*), DR5 (*death receptor 5*, també anomenat TRAIL-R2) i p75NTR. Aquests receptors poden induir mort per l'activació de caspases de manera independent a la mitocondria. A més de mort cel·lular, alguns membres d'aquesta família de receptors poden activar unes altres respostes cel·lulars, com la resposta inflamatòria, el creixement cel·lular i la proliferació.

Els receptors de mort contenen en la seva regió extracel·lular diferents dominis rics en cisteïnes. En la regió citoplasmàtica presenten el domini DD [(Itoh and Nagata, 1993) i (Tartaglia et al., 1993)] que permet la unió de molècules adaptadores i la transducció del senyal de mort. Aquest senyal es produeix, fins i tot, en presència d'inhibidors de la síntesi d'ARN i proteïnes [(Yonehara et al., 1989) i (Itoh et al., 1991)], fet que indica que els components de la maquinària de mort necessaris per la transducció del senyal estan ja presents a la cèl·lula i que el procés d'activació de la via extrínseca s'encarrega de reunir-los.

En l'exemple millor caracteritzat de la via extrínseca, la forma funcional soluble de FasL s'uneix al receptor de mort Fas induint la trimerització d'aquest. Això té com a resultat el reclutament de la molècula adaptadora FADD a través del domini DD de Fas i el reclutament de múltiples molècules de pro-caspasa 8 a través del domini DED de la molècula FADD (Muzio et al., 1996). La proximitat de les molècules de caspasa 8, que resulta del seu reclutament al complex trimèric Fas-FADD, causa la seva activació i a l'activació subseqüent de les caspases efectores (com la caspasa 3 i la 7) per processament proteolític (Figura 1).

- 1.1.1.2.2.2.- Via intrínseca

Al llarg de l'evolució, les cèl·lules eucariotes han organitzat la maquinària molecular que participa en la via intrínseca de mort al voltant de la mitocondria, orgàdul compost per dues membranes altament especialitzades que defineixen dos compartiments diferents: la matriu mitocondrial i l'espai intermembranós.

Quan en una cèl·lula s'activa el programa intrínsec de mort es produeix la permeabilització de la membrana mitocondrial externa i, com a conseqüència, l'alliberament de proteïnes pro-apoptòtiques de l'espai intermembranós (Hengartner, 2000). Entre les proteïnes que s'alliberen al citoplasma en aquestes condicions es troba el citocrom c i SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*, també conegut com DIABLO, per *direct IAP-binding protein with low pI*). El citocrom c un cop alliberat s'uneix a la proteïna adaptadora Apaf-1 per formar un complex multiproteic anomenat apoptosoma (Adams and Cory, 2002). La unió de citocrom c a Apaf-1 produeix un canvi conformacional d'aquesta última i s'indueix la seva oligomerització de manera dependent d'ATP, fet que permet el reclutament de la procaspasa 9 per unió a Apaf-1 a través dels seus dominis CARD. Com a conseqüència, la caspasa 9 s'activa per un canvi de conformació i desencadena la fase executora del programa de mort al induir l'activació de la caspasa 3 i 7 [revisat a (Hengartner, 2000)] (Figura 1).

L'activació d'aquestes caspases es pot inhibir per algunes proteïnes que es coneixen com proteïnes inhibidores de la apoptosi, IAPs. Per exemple, XIAP té la capacitat d'inhibir directament l'activitat caspasa. Unes altres proteïnes que poden inhibir l'activitat de les caspases són les E3 lligases perquè participen en la seva degradació [revisat a (Bredesen et al., 2006)]. Per altra banda, la capacitat inhibidora de les IAPs es pot contrarestar per proteïnes com la SMAC, que un cop alliberada de la mitocondria, s'uneix a les proteïnes IAP i bloqueja la seva activitat [revisat a (Hengartner, 2000) i (Bredesen et al., 2006)].

- 1.1.1.2.2.1.- Família Bcl-2

La via intrínseca mitocondrial del programa de mort cel·lular es pot activar per una gran diversitat d'estímuls externs o interns. Però malgrat la diversitat, aquests diferents estímuls convergeixen en causar dany mitocondrial i activar les proteïnes pro-apoptòtiques de la família Bcl-2 (Hengartner, 2000).

Els components de la família de proteïnes Bcl-2 són reguladors crítics de la mort cel·lular (Adams and Cory, 1998; Gross et al., 1999). Tots els membres d'aquesta família de proteïnes contenen com a mínim un dels quatre dominis d'homologia amb Bcl-2 altament conservats, BH1-4 (*conserved Bcl-2 homology domains 1-4*).

La família Bcl-2 es subdivideix en 3 grups: les proteïnes anti-apoptòtiques multidomini que contenen BH1-4 (com Bcl-2 i Bcl-X_L), les proteïnes pro-apoptòtiques multidomini que conserven l'estructura del primer grup però els manca el domini BH4 (com Bax i Bak) i les proteïnes pro-apoptòtiques que només posseeixen el domini BH3 ('*BH3 only*') (com Bim, Dp5/HRK, Bid i Bad) (Becker and Bonni, 2004).

Els membres multidomini de la família Bcl-2 es troben associats a la membrana mitocondrial externa. En resposta a un senyal de mort, Bax i Bak s'activen a través d'un canvi conformacional que estimula la seva oligomerització dins de la membrana mitocondrial externa i en conseqüència, es formen porus a la membrana mitocondrial que provoquen l'alliberament de diferents molècules, entre les quals es troba el citocrom c (Gross et al., 1999). El mecanisme exacte mitjançant el qual les proteïnes Bcl-2 regulen el procés de mort cel·lular encara no està establert amb precisió. No obstant, a causa de que els membres pro- i anti-apoptòtics de la família Bcl-2 formen homo- i hetero-dímers, la quantitat de les proteïnes pro- i anti-apoptòtiques determinarà el resultat funcional d'aquestes associacions i per tant, el destí d'una cèl·lula determinada [revisat a (Becker and Bonni, 2004)].

- 1.1.1.2.2.3.- Bid: punt de trobada

Encara que les vies extrínseca i intrínseca de mort poden funcionar de manera independent, existeix un punt de contacte entre elles que integra ambdues senyals

(Figura 1). Aquest punt és la proteïna Bid, un membre pro-apoptòtic de la família Bcl-2. Bid s'activa a nivell post-traducciona mitjançant l'acció de la caspasa 8, que indueix la hidròlisi d'aquesta proteïna en el seu extrem N-terminal. El fragment p15 C-terminal de Bid, tBid (*truncated Bid*), es transposa a la mitocondria on activa directament a Bax i Bak, la qual cosa provoca l'alliberament de citocrom c i altres proteïnes de l'espai intermembranós [revisat a (Gross et al., 1999) i (Bredesen et al., 2006)]. El paper de Bid en la mort que es produeix en el sistema nerviós no s'ha investigat minuciosament. No obstant, sembla que Bid podria tenir un paper rellevant en la mort observada en isquèmia [revisat a (Becker and Bonni, 2004)].

- 1.1.1.2.3.- *Vies bioquímiques de la mort cel·lular programada independent de caspases*

En els primers estudis del programa de mort cel·lular en *C.elegans* duts a terme pel grup de Horvitz ja hi havia evidència de l'execució de la PCD en l'absència de caspases (Ellis and Horvitz, 1986). La caracterització del mutant *ced-3* de *C.elegans* va mostrar que un tipus de cèl·lules de la gònada masculina morien per PCD fins i tot en l'absència de *ced-3* (Ellis and Horvitz, 1986). En mamífers també existeixen evidències de PCD independent de caspases. Algunes de les proteïnes mitocondrials que són alliberades com a resultat de la permeabilització de la membrana mitocondrial externa poden promoure la mort independent de caspases a través de mecanismes que encara no estan gaire establerts [revisat a (Kroemer and Martin, 2005) i (Abraham and Shaham, 2004)]. En estudis realitzats amb les proteïnes mitocondrials com tBid, Bim i Bad adreçats a esbrinar el paper d'aquestes en la PCD van mostrar que aquestes proteïnes, que se sap que promouen l'activació de les caspases i l'apoptosi, poden induir mort cel·lular independentment d'Apaf-1 i de les caspases (Cheng et al., 2001). Concretament, s'ha vist que els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) deficientes en *Apaf-1* (*Apaf-1*^{-/-}) moren en resposta a la sobreexpressió d'aquestes proteïnes que només contenen el domini BH-3 i, a més, en aquestes cèl·lules no es detecta activació de caspases ni la mort és inhibida per l'inhibidor de caspases zVAD.fmk (Cheng et al., 2001).

La mort cel·lular programada independent de caspases es definiria com el suïcidi cel·lular que s'indueix en condicions pro-apoptòtiques però que succeeix en absència d'activació de caspases [revisat a (Chipuk and Green, 2005)]. La mort cel·lular

independent de caspases no presenta les característiques morfològiques de l'apoptosi com la condensació de la cromatina, la fragmentació de l'ADN o la formació de protuberàncies a la membrana plasmàtica, però apareixen alteracions a nivell del nucli amb una lleugera condensació de la cromatina i una aparença flocular (Chipuk and Green, 2005).

Tot i que sembla clar que existeix aquesta mort programada independent de caspases, encara no es coneixen quins són els substituïts de les caspases que permeten l'execució d'aquest programa de mort. Hi ha certes evidències que semblen suggerir que altres proteases com les catèpsines, les calpaines i el granzim B serien les responsables d'aquest procés [revisat a (Abraham and Shaham, 2004)].

A més, encara que està ben establert que l'activació de les caspases és suficient com per induir mort cel·lular, diferents experiments amb els inhibidors de caspases indiquen que, en cèl·lules de mamífer on hi ha activació del programa de mort i es detecta activació de caspases, la inhibició de les caspases sovint no és suficient per evitar la mort cel·lular (Kroemer and Martin, 2005). En aquests casos en que tot i haver activació de caspases, la inhibició d'aquestes no bloqueja la mort cel·lular, quan s'inhibeixen les caspases sovint es dona un canvi en les manifestacions morfològiques de la mort cel·lular, i es passa de l'aspecte clàssic de l'apoptosi a un altre tipus de mort que s'assembla lleugerament a l'apoptosi (Kroemer and Martin, 2005).

Dins d'aquest paradigma trobaríem doncs tres tipus de relació entre la mort i l'activació de les caspases: la mort cel·lular a través de l'activació de caspases, la mort cel·lular amb activació de caspases i la mort cel·lular sense activació de caspases, essent les dues últimes independents de caspases (Kroemer and Martin, 2005).

1.1.2.- Mort programada en els trastorns neurodegeneratius

- 1.1.2.1.- Trastorns neurodegeneratius: definició

El terme neurodegeneració fa referència al procés de deteriorament progressiu de les neurones. Així, es consideren malalties neurodegeneratives tots aquells trastorns que es produeixen com a resultat de qualsevol condició patològica que afecta de forma primària a l'estructura i la funció de les neurones [(Przedborski et al., 2003);(Graeber

and Moran, 2002)]. Per aquesta raó, els trastorns del sistema nerviós central que no afecten principalment a les neurones no són considerats neurodegeneratius, com seria el cas de la isquèmia i trauma cerebrals, hipòxia, neoplasmes o l'esclerosi múltiple.

- 1.1.2.2.- Classificació de les malalties neurodegeneratives

S'estima que actualment existeixen aproximadament un centenar de malalties neurodegeneratives diferents. Moltes de les característiques clíniques i patològiques d'aquestes malalties es solapen i per això es difícil establir criteris de classificació.

La classificació de malalties neurodegeneratives més utilitzada es basa en una combinació de característiques anatomopatològiques i clíniques. En primer lloc les malalties neurodegeneratives del sistema nerviós central es distribueixen en quatre grups segons l'àrea cerebral afectada: malalties del còrtex cerebral (Alzheimer, Pick, Creutzfeld-Jacob o encefalopatia espongiforme), dels ganglis basals (Parkinson i Huntington), del tronc cerebral o cerebel (Ataxia de Friedreich) i de la medulla espinal (Esclerosi lateral amiotròfica). Dins de cadascun d'aquests grups cada malaltia es classifica segons les seves característiques clíniques principals. Així, en el cas de les malalties del còrtex cerebral aquestes es divideixen entre les que presenten demència i les que no, i en el cas de les malalties dels ganglis basals, que es caracteritzen per la presència de moviments anormals, es poden dividir segons les característiques d'aquests [revisat a (Przedborski et al., 2003)].

En els últims 20 anys hi ha hagut grans avenços en les tècniques neurohistològiques, fet que ha significat una millora en la sensibilitat i especificitat del diagnòstic d'aquestes malalties i per tant, una millora també en la precisió de la seva classificació. D'altra banda, recentment ha sorgit una nova classificació de les malalties neurodegeneratives en base a les alteracions a nivell molecular que es postulen com causa de la malaltia. D'aquesta manera trobaríem el grup de les malalties amb repeticions de trinucleòtids (Huntington), les prionopaties (Creutzfeld-Jacob), les sinucleinopaties (Parkinson) i les tauopaties (Alzheimer), entre d'altres [revisat a (Przedborski et al., 2003)]. Aquest tipus de classificació semblaria menys ambigua i més pràctica, a nivell clínic i terapèutic, que l'anterior, però existeix controvèrsia degut al desconeixement que encara avui existeix sobre els mecanismes moleculars responsables de la neurodegeneració.

- 1.1.2.3.- Quines són les causes de les malalties neurodegeneratives?

Avui en dia es desconeixen les causes de la major part de les malalties neurodegeneratives i els mecanismes mitjançant els quals s'inicia el procés neurodegeneratiu encara no han estat establerts.

En alguns trastorns com la malaltia de Huntington existeix una clara etiologia genètica. Per contra, en d'altres, com la malaltia d'Alzheimer, la majoria dels casos són esporàdics i les mutacions genètiques expliquen només un 3-5% de tots els casos (Martin, 1999). D'altra banda, fins i tot en aquells trastorns en els quals s'ha establert amb precisió la seva etiologia, com la mutació en el gen de la Huntingtina que provoca la malaltia de Huntington, es desconeix el mecanisme mitjançant el qual la proteïna mutada produeix la neurodegeneració.

Les dues característiques generals més destacables en els trastorns neurodegeneratius són un curs crònic i progressiu durant un període de temps relativament llarg i una mort selectiva de poblacions neuronals específiques. Degut a que els mecanismes moleculars responsables del procés neurodegeneratiu romanen desconeguts, existeix un elevat grau de confusió en relació a quin és el paper de la mort cel·lular en aquest procés respecte a si és la causa o l'efecte de la neurodegeneració.

- 1.1.2.4.- Quin és el paper de la mort cel·lular programada en els trastorns neurodegeneratius?

S'ha postulat que la mort de poblacions neuronals específiques és la responsable dels diversos trastorns neurodegeneratius. Mentre que el paper de la PCD amb morfologia apoptòtica durant el desenvolupament del sistema nerviós està ben descrit en la literatura, existeix controvèrsia en quant a la seva contribució en els trastorns neurodegeneratius [revisat a (Graeber and Moran, 2002);(Vila and Przedborski, 2003) i (Becker and Bonni, 2004)]. Estudis recents, però, indiquen clarament que existeix activació de diversos mecanismes bioquímics del programa de mort en les diverses malalties neurodegeneratives tot i en absència de morfologia apoptòtica i abans de que hi hagi una pèrdua significativa de neurones [(Becker and Bonni, 2004);(Vila and Przedborski, 2003)]. Per aquesta raó vàrem decidir estudiar el paper de la NP1, una

proteïna que per estudis previs del nostre laboratori se sap que està implicada en el programa de mort, en els trastorns neurodegeneratius com la malaltia d'Alzheimer.

L'esforç inicial de diversos grups per tal de demostrar l'existència de cèl·lules apoptòtiques en els teixits *post mortem* de malalts no va tenir èxit (Vila and Przedborski, 2003). Això és degut probablement a que l'estudi del teixit humà *post mortem* és molt complex per les limitacions tècniques que comporta. A més, la pèrdua de neurones és un fenomen quantitativament petit que s'observa en els estadis més tardans del procés de degeneració i que sobretot constitueix l'últim efecte més que la causa del trastorn neurodegeneratiu. S'ha vist que les manifestacions clíniques dels trastorns neuro-degeneratius, com la demència i les alteracions cognitives de la malaltia d'Alzheimer, són resultat de les alteracions de la funció neuronal i no de la pèrdua de neurones (Selkoe, 2002). Així, la mort neuronal s'ha de considerar com la última conseqüència d'un llarg procés de disfunció neuronal produïda per diferents causes segons el tipus de trastorn.

Estudis recents indiquen que en trastorns neurodegeneratius, com la malaltia d'Alzheimer, existeix activació de diversos mecanismes del programa de mort cel·lular abans de que hi hagi una pèrdua significativa de neurones i en absència de morfologia apoptòtica. Per exemple, s'ha demostrat que la caspasa-6 està activada en les neurites distròfiques de pacients amb la malaltia d'Alzheimer, fet que proporciona evidència a favor de la hipòtesi de que l'activació de mecanismes del programa de mort neuronal apoptòtica en neurones adultes diferenciades pot induir dany sinàptic molt abans de produir mort cel·lular (Cribbs et al., 2004).

La mort neuronal fisiològica en el cervell en desenvolupament i la mort cel·lular patològica en el cervell adult comparteixen mecanismes moleculars en la fase efectora. No obstant, hi ha diferències clau en els estímuls pels quals es desencadena la mort. Mentre que la retirada de factor tròfic té un paper molt important en la mort cel·lular durant el desenvolupament i dona lloc a una mort cel·lular amb un curs temporal ràpid i amb morfologia apoptòtica, la mort cel·lular induïda en els trastorns neurodegeneratius vindria donada per estímuls tòxics que són el resultat de disfuncions genètiques o bioquímiques i que donen lloc a dany en les connexions sinàptiques i a una alteració funcional de la cèl·lula que només en últim terme condueixen a la mort cel·lular. Un

factor que es considera rellevant en les malalties neurodegeneratives és la possible toxicitat induïda per plegaments anormals de proteïnes i la formació d'agregats, com passa en la malaltia d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington i en l'esclerosi lateral amiotròfica [revisat a (Yuan and Yankner, 2000)] (Taula 1).

Malaltia	Dipòsits proteics	Proteïna tòxica
Alzheimer	Plaques extracel·lulars	A β
	Oligòmers extracel·lulars	A β
	Cabdells Neurofibrilars	Tau
Parkinson	Cossos de Lewy	α -sinucleïna
Creutzfeld-Jacob	Placa prionica	PrP ^{sc}
Huntington	Inclusions nuclears i citoplasmàtiques	Huntingtina amb expansions de poliglutamines
Demència Frontotemporal	Cabdells neurofibrilars	Tau
Esclerosi lateral amiotròfica	Cossos de Bunina	SOD1

Taula 1. Proteïnes amb plegaments anormals

Però recentment, i particularment en la malaltia d'Alzheimer, sembla que són les formes solubles d'agregats d'A β els responsables de la toxicitat i no els agregats precipitats de la proteïna en forma de plaques (Cleary et al., 2005).

- 1.1.2.4.1.- *Mort cel·lular programada en la malaltia d'Alzheimer*

En la malaltia d'Alzheimer, la pèrdua de memòria i la discapacitat cognitiva van acompanyades de la degeneració de determinades poblacions neuronals en l'hipocamp i el còrtex [revisat a (Becker and Bonni, 2004)]. La contribució de l'apoptosi a la pèrdua de neurones en la malaltia d'Alzheimer és difícil d'avaluar degut a la cronicitat del procés que té lloc en aquesta malaltia. Existeixen evidències bioquímiques que indiquen que hi ha PCD en la malaltia d'Alzheimer ja que s'ha detectat la presència de caspasa 3, 8 i 9 activades en neurones hipocampals afectades per l'Alzheimer [(Stadelmann et al.,

1999);(Rohn et al., 2001) (Rohn et al., 2002)]. Tot i així, la participació directa de les caspases en la mort neuronal observada en la malaltia d'Alzheimer encara es desconeix.

Les causes de la neurodegeneració en la malaltia d'Alzheimer es troben sota actiu debat. Al llarg dels anys s'han implicat diferents molècules en la causa d'aquesta neurodegeneració, com el pèptid A β i els seus agregats, la proteïna Tau, les presenilines i la apolipoproteïna E (Yuan and Yankner, 2000). En els cervells de malalts d'Alzheimer es troben dos tipus d'agregats proteics, els cabdells neurofibril·lars que són agregats intracel·lulars de la proteïna tau hiperfosforilada i les plaques amiloidees que són agregats extracel·lulars del pèptid A β . Existeixen diferents models animals de la malaltia d'Alzheimer que estan ajudant a avançar en l'estudi de les causes de la neurodegeneració, com són els ratolins que expressen APP mutant [(Sturchler-Pierrat et al., 1997), (Hsiao et al., 1996) i (Games et al., 1995)], els dobles transgènics que expressen tant APP mutant com la PS1 (Borchelt et al., 1996), i el triple transgènic que expressa APP mutant, PS1 mutant i tau mutant (Oddo et al., 2003). Aquests models transgènics permeten investigar la contribució de cadascuna d'aquestes proteïnes al procés neurodegeneratiu (vegeu apartat 5)

- 1.1.2.4.2.- *Mort cel·lular programada en la malaltia de Parkinson*

La malaltia de Parkinson, que es caracteritza per lentitud de moviments, rigidesa, tremolor i inestabilitat postural, és una altra de les malalties neurodegeneratives de les quals es desconeix la causa. Els símptomes de la malaltia són atribuïts a la pèrdua de neurones dopaminèrgiques en la *substantia nigra pars compacta* (SNPC). Tal i com passa amb la malaltia d'Alzheimer, s'està realitzant recerca intensiva per determinar si la PCD contribueix a la pèrdua de neurones observada en els cervells de Parkinson (Vila and Przedborski, 2003). En diferents estudis realitzats en cervells de pacients de Parkinson s'ha detectat un increment en la immunoreactivitat de Bax, un increment de l'expressió i redistribució subcel·lular de Bcl-x_L i un increment de l'activitat de les caspases 3, 8 i 9 en les cèl·lules dopaminèrgiques de la SNPC (Vila and Przedborski, 2003). Els resultats obtinguts a partir dels estudis en models murins de Parkinson basats en la sobreexpressió de l' α -sinucleïna demostren la participació de les vies moleculars de la PCD en la mort de les neurones dopaminèrgiques a la SNPC. S'ha vist que el

bloqueig de la PCD a diferents nivells, però sempre per sobre de la seva fase executora, produeix una reducció del procés neurodegeneratiu, mentre que el bloqueig a nivells inferiors, com per exemple, en la fase de l'activació de les caspases, dona lloc a resultats variables que indiquen que un cop el programa d'execució de les caspases està activat, la seva inhibició només retardarà la mort cel·lular però no la bloquejarà de manera definitiva. En conjunt, fins ara s'ha obtingut evidència significativa de que els mecanismes del programa de mort participen en la degeneració de les neurones dopaminèrgiques (Vila and Przedborski, 2003).

- 1.1.2.4.3.- Mort cel·lular induïda per les repeticions de poliglutamines

Les malalties neurodegeneratives causades per proteïnes que contenen una expansió de seqüències de poliglutamines es caracteritzen per una pèrdua selectiva de determinades subpoblacions de neurones, però no està clar si la mort d'aquestes neurones es produeix per apoptosi o com a resultat de l'activació del programa de mort. Les proteïnes amb les repeticions de poliglutamines poden formar agregats *in vitro* i donar lloc a fibril·les similars a les formades pel pèptid A β en la malaltia d'Alzheimer (Scherzinger et al., 1997). Aquests agregats de proteïnes s'observen en els cervells de pacients de la malaltia de Huntington i de l'atàxia espinocerebelar tipus 1 i 3 entre d'altres (Lunkes and Mandel, 1997).

Els mecanismes activats en la mort cel·lular que es produeix en la malaltia de Huntington han estat extensament estudiats. La malaltia de Huntington es caracteritza per l'aparició de moviments coreïcs involuntaris que resulten de la pèrdua selectiva de neurones a l'estriat i al còrtex cerebral i se sap que és causada per les expansions del trinucleòtid CAG en el gen de la huntingtina (Brandt et al., 1996). En cèl·lules en cultiu s'ha vist que la huntingtina intranuclear induïx l'activació de la caspasa-3 i l'alliberament de citocrom c al citosol i s'indueix apoptosi (Li et al., 2000b). Altres estudis *in vitro* també recolzen el paper de les caspases en la mort induïda per l'expressió de huntingtina [(Sanchez et al., 1999), (Miyashita et al., 1999) i (Rigamonti et al., 2001)], i proposen el bloqueig de l'activació de les caspases com a diana terapèutica contra la malaltia de Huntington [revisat a (Vila and Przedborski, 2003)].

No obstant, segons un treball del 2000 del grup de Turmaine i col·laboradors, els resultats obtinguts en animals transgènics i en teixit de cervell humà de pacients de Huntington no recolzen la hipòtesi de la mort per apoptosi (Turmaine et al., 2000). El

grup de Turmaine va veure en un model animal de la malaltia de Huntington que les neurones que morien presentaven inclusions intranuclears i alteració de la membrana plasmàtica mantenint l'estructura dels orgànuls, i no presentaven ni fragmentació de l'ADN ni cap de les característiques morfològiques típiques de l'apoptosi. Aquestes neurones en degeneració també van ser observades en les mateixes regions dels cervells en pacients de Huntington. Els autors interpreten que el mecanisme de mort neuronal activat en pacients i en models animals de Huntington no es ni per necrosi ni per apoptosi [(Turmaine et al., 2000) i revisat a (Graeber and Moran, 2002)]. Aquest estudi, però, es troba en controvèrsia amb estudis anteriors realitzats en cervells de pacients de Huntington on s'han detectat cèl·lules apoptòtiques per la tècnica de TUNEL (*terminal transferase-mediated (TdT) deoxyuridine triphosphate (d-UTP)-biotin nick end labeling*) (Portera-Cailliau et al., 1995) i en estudis realitzats en models animals de Huntington on s'ha vist activació de diferents caspases (Ona et al., 1999).

Fins al moment, tot i que encara no es coneix com la huntingtina mutada indueix neurodegeneració, sembla clar que en la malaltia de Huntington hi ha activació de diferents caspases i que per tant, el bloqueig de la seva activació podria ser una de les dianes per bloquejar la neurodegeneració.

- 1.1.2.4.4.- Mort programada en l'esclerosi lateral amiotròfica

L'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) és una malaltia motora progressiva, caracteritzada per la degeneració de neurones motores en la medul·la espinal i el cervell, que resulta en paràlisi muscular. La identificació de mutacions en el gen que codifica per la superòxid dismutasa (SOD-1) en ALS familiar va permetre entendre una mica millor el procés patològic que té lloc en aquesta malaltia (Rosen, 1993). Encara que el mecanisme de toxicitat no està del tot establert, s'ha vist que la SOD-1 mutant pot formar agregats intraneuronals i induir estrès oxidatiu. Aquestes alteracions són similars als mecanismes patològics observats en la malaltia d'Alzheimer i en les malalties produïdes per les repeticions de poliglutamines (Cleveland, 1999). Moltes evidències suggereixen que l'activació de les caspases, i per tant el programa intrínsec de mort cel·lular, també seria un component essencial en la patologia d'ALS (Pasinelli et al., 1998) i (Li et al., 2000a).

2.- LA PENTRAXINA NEURONAL 1 I EL PROGRAMA DE MORT CEL·LULAR EN NEURONES

En comparació amb les neurones en desenvolupament, els mecanismes del programa de mort cel·lular en neurones diferenciades no han estat investigats en detall fins molt recentment. La hipòtesi neurotròfica assumeix un procés de mort passiva com a resultat de l'absència de suficient factor tròfic en neurones en desenvolupament. Tal com s'ha mencionat abans, no ha estat fins recentment que s'ha demostrat que la mort neuronal per privació de factor tròfic durant el desenvolupament depèn de l'activació d'una cascada de fenòmens bioquímics associats a la síntesi de noves proteïnes. Cal distingir però el mecanisme que activa el programa de mort en neurones en desenvolupament del que ho fa en neurones madures. Els resultats previs obtinguts al nostre laboratori indiquen que aquestes últimes no són tant susceptibles a la retirada de factor tròfic com les neurones en desenvolupament (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). En les neurones madures diferenciades, el programa de mort s'indueix preferentment quan hi ha una reducció dràstica de la seva activitat o per factors tòxics com els radicals lliures.

2.1.- NP1 en el programa de mort induït per reducció d'activitat

Un dels models *in vitro* millor documentats per investigar la mort cel·lular programada en les neurones madures és la mort induïda per condicions no-despolaritzants en cèl·lules granulars de cerebel en cultiu (D'mello et al., 1993);(Miller and Johnson, 1996) i (Chang and Wang, 1997). Les cèl·lules granulars de cerebel requereixen concentracions despolaritzants de potassi (25-30mM) per tal de mantenir-se en cultiu (Gallo et al., 1987). Quan aquestes neurones són madures, la reducció de la concentració extracel·lular de potassi produeix una mort cel·lular que és morfològicament apoptòtica. Aquesta mort cel·lular induïda per concentracions baixes de potassi està associada a fragmentació d'ADN i requereix la síntesi de nou d'ARN i proteïnes (D'mello et al., 1993). El tractament amb inhibidors de la síntesi proteica o d'ARN entre les 4 primeres hores d'exposició a la privació de potassi impedeix la mort cel·lular i produeix una recuperació total de l'ADN danyat (D'mello et al., 1993);(Galli et al., 1995) i (Watson et al., 1998). El reemplaçament d'altres concentracions de potassi durant les 4 hores següents a la privació de potassi resulta en el bloqueig de la pèrdua

cel·lular. No obstant, l'activació del programa de mort cel·lular es torna irreversible en el 50% de les cèl·lules granulars 6 hores després de l'exposició a baixes concentracions de potassi (Nardi et al., 1997).

Tot i que està ben establert que el tractament de les cèl·lules granulars de cerebel amb concentracions baixes de potassi activa el programa de mort apoptòtica que depèn de la síntesi de proteïnes letals, aquestes proteïnes letals no han estat identificades amb precisió. El nostre laboratori es va plantejar com a objectiu general identificar quines són aquestes proteïnes que es sintetitzen durant el programa de mort apoptòtica.

S'ha proposat que els mecanismes implicats en l'apoptosi induïda per la privació de potassi en les neurones granulars de cerebel són similars a aquells que operen en la mort neuronal durant el desenvolupament o en la que es produeix quan hi ha un bloqueig de l'activitat neuronal en estadis ja adults, que requereixen síntesi de nou d'ARN i proteïnes (D'mello et al., 1993). Per aquesta raó, l'estudi del gens l'expressió dels quals incrementa abans de que les neurones adquireixin el compromís a morir permet identificar les proteïnes letals que formen part del programa de mort.

- **2.1.1.- NP1 i l'expressió gènica durant el procés de mort**

Basant-nos en aquesta premissa, el nostre grup va investigar l'expressió gènica durant les fases primerenques del programa de mort cel·lular induït per la privació de potassi en cèl·lules granulars de cerebel de rata en cultiu. Utilitzant la tècnica de l'expressió gènica diferencial (*differential gene display*), es va aïllar un cADN que incrementava després de la privació de potassi. Aquest cADN era homòleg a l'extrem 3' de l'ARN missatger de la NP1. Tècniques com el *Northern revers* i el *Northern blot* van confirmar que el tractament de les neurones granulars de cerebel amb una baixa concentració de potassi induïx la sobreexpressió de l'ARN missatger de la NP1, amb un increment subseqüent dels nivells de la proteïna. Estudis de curs temporal van mostrar que la sobreexpressió de NP1 arriba a nivells màxims 4 hores després de l'exposició a la privació de potassi i 4 hores abans de que la mort neuronal sigui significativa (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001).

El tractament de les cèl·lules granulars de cerebel amb oligodeoxinucleòtids antisentit contra l'mARN de la NP1 redueix tant l'increment dels nivells d'aquesta proteïna com la mort neuronal. Aquests resultats constitueixen evidència d'una nova funció per la NP1 i indiquen que la NP1 forma part del programa de mort apoptòtica que s'activa quan es mantenen els cultius de cèl·lules granulars en condicions no-despolaritzants (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001).

En contrast amb l'increment d'expressió de NP1 que produeix el tractament amb baix potassi, aquest tractament no té el mateix efecte sobre l'expressió de NP2 (Pentraxina Neuronal 2), una altra proteïna de la família. La NP2, en canvi, s'indueix ràpidament i es regula dinàmicament per activitat neuronal elevada (Tsui et al., 1996) i (O'Brien et al., 1999). La implicació de la NP1 en el programa de mort en neurones granulars de cerebel en condicions d'absència de despolarització, així com la capacitat de la NP2 de promoure la formació de sinapsi van fer que el nostre grup proposés la següent hipòtesi: les pentraxines neuronals constitueixen un sensor gènic que regularia la supervivència o la mort de les neurones dependent de l'activitat sinàptica de la cèl·lula (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001).

- **2.1.2.- NP1 i tractaments neuroprotectors**

A més del treball realitzat amb els ODNs antisentit contra l'mARN de la NP1, el nostre laboratori va proporcionar, amb el tractament neuroprotector amb liti, més evidències del paper de la NP1 en la mort cel·lular induïda per reducció d'activitat (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). Els tractaments que inhibeixen l'apoptosi induïda per la privació de potassi, com l'IGF (*insulin-like growth factor-1*, factor de creixement similar a la insulina-1) o el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*, factor neurotròfic derivat del cervell), bloquegen l'expressió de gens letals mitjançant l'activació de les vies de senyalització de supervivència cel·lular [(Dudek et al., 1997);(D'mello et al., 1997) i (Bonni et al., 1999)]. Per altra banda, el tractament amb liti promou la supervivència de les cèl·lules granulars de cerebel tractades amb privació de potassi (D'mello et al., 1994) mitjançant un mecanisme dual que comprèn l'increment de la transcripció de gens de supervivència com el *bcl-2* i la inhibició de l'expressió de gens pro-apoptòtics com *bax* i *p53* [(Chen and Chuang, 1999);(Manji et al., 2000) i (Chen et al., 1999)]. Experiments previs del nostre grup van demostrar que el tractament agut

amb liti inhibeix de manera significativa la sobreexpressió de NP1 induïda per privació de potassi i aquest efecte va acompanyat d'una reducció molt significativa de la mort cel·lular de les cèl·lules granulars de cerebel. Així, la inhibició de la sobreexpressió de NP1 pel tractament amb liti està associada amb els efectes neuroprotectors d'aquest fàrmac (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). Aquests resultats varen proporcionar per primera vegada evidència de relació causa-efecte entre expressió de NP1 i mort neuronal i recolzaren la hipòtesi de que la NP1 forma part del programa intrínsec de mort neuronal.

2.2.-NP1 en el dany per hipòxia-isquèmia

L'any 2004 el grup de Hossain i col·laboradors va publicar un article sobre la implicació de la NP1 en el dany induït per hipòxia-isquèmia (HI) (Hossain et al., 2004) fet que va suposar la confirmació dels resultats obtinguts prèviament al nostre laboratori que varen establir per primera vegada que la NP1 forma part del programa de mort (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001).

El dany cerebral induït per HI neonatal és una de les causes principals de mortalitat i discapacitat neurològica en els nens i fins al moment no existeix cap teràpia prometedora (Lorenz et al., 1998) i (Johnston, 1997). La mort neuronal induïda en les primeres fases d'HI, coneguda com a dany primerenc, és per necrosi o excitotòxica (Northington et al., 2001b) i es troba en el que s'anomena nucli isquèmic. En canvi, la mort neuronal retardada o dany secundari que té lloc hores o inclòs dies després del dany, es creu que és principalment apoptòtica (Northington et al., 2001a) i es troba en la zona anomenada penombra, que és la zona que es troba al voltant del nucli isquèmic.

Hi ha evidències de que l'excitotoxicitat causada per la sobre-estimulació dels subtipus AMPA i NMDA de receptors de glutamat juga un paper important en el dany produït per HI en el cervell [(Barks and Silverstein, 1992); (Porteracailliau et al., 1997); (Johnston, 2001) i (Johnston et al., 2001)]. A més, el cervell neonatal és més propens a l'excitotoxicitat que l'adult (Barks and Silverstein, 1992); (Johnston, 2001) i (Johnston et al., 2001). No obstant, els mecanismes a través dels quals es modulen els receptors de glutamat en resposta a HI encara romanen desconeguts.

En cervells neonatals de rata on s'havia induït HI, el grup de Hossain va veure, mitjançant assaigs d'immunofluorescència, una elevada expressió d'NP1 en el còrtex ipsilateral a les 6 hores de la inducció d'HI fins a 7 dies i a les regions CA1 i CA3 de l'hipocamp 24 hores després de la HI fins a 7 dies (Hossain et al., 2004). Si ens basem en els estudis anteriors que demostren que la NP1 forma part del programa de mort cel·lular (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001), és molt probable que la sobreexpressió de NP1 observada en cervells on s'ha induït HI sigui només a la zona de penombra on apareix la mort apoptòtica i no al nucli isquèmic on les neurones moren per excitotoxicitat.

En cultius primaris de cèl·lules corticals, van veure que la NP1 s'indueïa en el dany cerebral per HI i que la transfecció amb oligodeoxinucleòtids antisentit dirigits contra l'ARN missatger de la NP1, els mateixos que es varen utilitzar al nostre grup, reduïen la mort cel·lular induïda per la hipòxia i per la sobreactivació dels receptors AMPA. A la vegada, en neurones corticals van observar que la NP1 co-localitzava amb les agrupacions de GluR1, subunitat del receptor AMPA, i que la hipòxia indueix un increment de les interaccions entre NP1 i GluR1 de manera temps-depenent. El grup de Hossain interpreta aquests resultats suggerint que la inducció de NP1 modularia el dany per HI, mitjançant les interaccions amb GluR1 i potencialment amb altres subtipus de receptors de glutamat, contribuint d'aquesta manera, al dany i la mort neuronal (Hossain et al., 2004).

3.- TRAJECTES DE SENYALITZACIÓ DE VIDA I MORT I REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE NP1

Un cop demostrat que la NP1 forma part del programa de mort que s'activa en cèl·lules granulars de cerebel madures quan es redueix la concentració de potassi (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001) el següent objectiu del nostre laboratori va anar dirigit a investigar quins eren els trajectes de senyalització que regulen l'expressió de NP1. Per això es va estudiar la influència de les diferents vies de transducció de senyals que controlen la mort i la supervivència neuronal sobre l'expressió de NP1 (Enguita et al., 2005).

Tant l'absència de senyalització de supervivència com la presència de senyalització de mort indueixen l'activació del programa de mort neuronal. Les vies de supervivència millor estudiades són les de Ras-MAPK i la de PI3K-AKT (fosfatidilinositol 3'-cinasa, *phosphatidylinositol 3'-kinase*) [revisat a (Brunet et al., 2001); (Harper and LoGrasso, 2001)]. Aquestes dues vies actuen inhibint directament la maquinària de mort i induint canvis en l'expressió gènica que afavoreixen la supervivència cel·lular.

En comparació a la senyalització de supervivència, les vies de senyalització que activen el programa de mort han estat menys estudiades. La major part d'estímuls de mort convergeixen en una sèrie restringida de vies efectores. Nombrosos estudis han implicat a les cinases p38MAPK i JNK (c-Jun NH₂-terminal) en la mort neuronal [revisat a (Harper and LoGrasso, 2001)]. A més d'aquestes cinases, en els últims anys s'ha reconegut el paper modulador de la GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) en processos de mort programada [revisat a (Grimes and Jope, 2001) i (Beurel and Jope, 2006)].

El destí d'una cèl·lula depèn del balanç de la integració de senyals de vida i de senyals de mort. La supervivència de les cèl·lules granulars de cerebel madures després de la retirada de sèrum i potassi es pot mantenir de diverses maneres: restablint la concentració despolaritzant de potassi (Gallo et al., 1987), afegint AMP cíclic (D'mello et al., 1993), tractant amb liti (D'mello et al., 1994) o per exposició a factors de creixement com l'IGF-1 [(D'mello et al., 1993) i (Dudek et al., 1997)]. Està ben establert que tots aquests factors de supervivència convergeixen en l'activació de la

serina/treonina cinasa AKT (Crowder and Freeman, 1998);(Vaillant et al., 1999) i (Kumari et al., 2001)].

En neurones simpàtiques, l'activació de la via de la cinasa JNK sembla necessària i suficient per induir apoptosi després de la retirada d'NGF (factor de creixement neuronal) [(Estus et al., 1994) i (Ham et al., 1995)]. Estudis recents, però, indiquen que l'apoptosi induïda per privació de potassi en cèl·lules granulars de cerebel implicaria també l'activació d'altres vies. En aquestes cèl·lules, la inhibició de la via de JNK proporciona només protecció transitòria contra la mort neuronal induïda per concentracions no despolaritzants de potassi (Harris et al., 2002a) indicant que hi ha altres vies que s'activen sota aquestes condicions.

En els nostres experiments dirigits a investigar els trajectes de senyalització que regularien l'expressió de NP1 (Enguita et al., 2005) en primer lloc vàrem estudiar la via de transducció de senyals de PI3K-AKT, ja que es tracta d'una de les principals cascades que controla la supervivència de les neurones. En segon lloc, vàrem estudiar el paper de l'activació de la via de senyalització de mort que s'activa a través de p38MAPK, ja que estudis previs del grup de Yamagishi i col·laboradors (Yamagishi et al., 2001) suggerien que aquesta cinasa està implicada en la mort induïda per privació de potassi en les cèl·lules granulars de cerebel. En tercer lloc vam investigar la via de senyalització de mort que s'activa a través de JNK ja que prèviament s'havia descrit que la seva inhibició bloqueja el procés de mort programada activat per reducció d'activitat en les granulars en cultiu (Harris et al., 2002b). I en últim lloc vàrem estudiar la via de GSK-3 basant-nos en els estudis del grup de Cross i col·laboradors que demostren que inhibidors selectius de GSK-3 protegeixen a les cèl·lules granulars de cerebel del procés de mort activat per concentracions no despolaritzants de potassi (Cross et al., 2001).

3.1.- Neurotrofines

Les proteïnes de secreció juguen un paper molt important en la regulació del nombre de neurones durant el desenvolupament del sistema nerviós. El grup de proteïnes millor estudiat és la família de les neurotrofines, la qual està formada pel NGF, el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), la neurotrofina-3 (NT3) i la neurotrofina-4/5 (NT4/5) [revisat a (Bibel and Barde, 2000)].

A més de jugar un paper clau en la supervivència de les neurones, també estan implicades en altres processos com la diferenciació neuronal, el creixement neurític i l'activitat sinàptica. Les neurotrofines són sintetitzades i alliberades per les neurones i tant la seva síntesi com la seva alliberació depenen d'activitat neuronal (Thoenen, 1995).

- **3.1.1.- Receptors de les neurotrofines**

Les neurotrofines s'uneixen a dos tipus de receptors transmembrana: els receptors Trk (*tropomyosin receptor kinase*) i el receptor de neurotrofina p75 (p75^{NTR}, *p75 neurotrophin receptor*). Ambdós receptors es troben sovint a la mateixa cèl·lula i coordinen i modulen la resposta de les neurones a les neurotrofines [revisat a (Friedman and Greene, 1999) i (Bibel and Barde, 2000)].

Aquest sistema dual permet la transducció de senyals molt diferents després de la unió al seu lligand, senyals tan oposades com la senyalització de mort cel·lular per p75^{NTR} o de supervivència a través dels Trk.

- 3.1.1.1.- Transducció de senyals a través dels receptors Trk

La unió de les neurotrofines als receptors Trk produeix l'activació de vies que indueixen senyals de supervivència i de diferenciació neuronal [revisat a (Friedman and Greene, 1999)]. A partir d'aquesta unió s'activen principalment 3 cascades de senyalització.

La més destacada és l'activació de la via de Ras/Raf/MEK/ERK que juga un paper principal en el creixement neurític i altres respostes a les neurotrofines com la diferenciació neuronal. L'activació d'aquesta via resulta de la formació de diversos complexos de molècules adaptadores [revisat a (Friedman and Greene, 1999) i (Bibel and Barde, 2000)].

Un segon element en la senyalització per neurotrofines és la PI3K. PI3K no interactua directament amb els receptors Trk, ho fa a través de proteïnes adaptadores com IRS (*insulin receptor substrates*, IRS-1 i IRS-2) i Gab-1 (*Grb-associated binder-1*) [(Holgado-Madruga et al., 1997) i (Yamada et al., 1997)]. La PI3K es troba especialment implicada en la supervivència neuronal via l'activació de la cinasa PKB (*protein kinase*

B)/AKT (Crowder and Freeman, 1998) que condueix a la inhibició de l'activitat de la cinasa GSK3 β per fosforilació en serina-9 (Cross et al., 1995).

El tercer mediador de l'acció de les neurotrofines és la fosfolipasa C gamma, PLC- γ . La associació entre la PLC- γ i els Trk regula els nivells de Ca²⁺ intracel·lulars i l'activitat de la proteïna cinasa C a través del trencament del PIP2 (fosfatidilinositol-3,4- bifosfat) a DAG (diacil glicerol) i IP3 (inositol 1,4,5-trifosfat). Aquesta via sembla jugar un paper important en l'alliberament de neurotrofines mediat per les pròpies neurotrofines (Canossa et al., 1997) i en la plasticitat sinàptica [revisat a (Bibel and Barde, 2000)].

- 3.1.1.2.- Senyalització a través del receptor p75^{NTR}

La funció d'aquest receptor varia considerablement depenent del context cel·lular, tipus cel·lular i estat de desenvolupament en que s'expressa [revisat a (Barker, 1998)]. A més, moltes cèl·lules co-expressen els receptors Trk i p75^{NTR}, i la interacció entre els dos tipus de receptors modula la senyal resultant de la unió amb les neurotrofines (Bibel et al., 1999). Aquesta interacció també modula l'afinitat dels receptors Trk per les neurotrofines i podria contribuir a l'habilitat dels receptors Trk per discriminar un lligand preferent entre les altres neurotrofines [revisat a (Friedman and Greene, 1999)].

Apart de modular la unió i la funció dels receptors Trk, el p75^{NTR} senyalitza mort cel·lular quan s'expressa en absència de Trk [(Yoon et al., 1998) i (Davey and Davies, 1998)].

En cèl·lules de Schwann i en una línia cel·lular de fibroblast s'ha vist que la unió d'NGF a p75^{NTR} produeix una activació d'NF κ B (Khursigara et al., 1999), però les conseqüències d'aquesta activació romanen desconegudes.

Una altra via de senyalització activada per p75^{NTR} és la via de JNK mitjançant la qual indueix mort cel·lular (Casaccia-Bonnet et al., 1996).

El p75^{NTR} uneix, a part de les neurotrofines, a altres molècules, com una glicoproteïna del virus de la ràbia (Tuffereau et al., 1998) i el pèptid β -amiloid (Kuner et al., 1998) entre d'altres.

3.2.- MAPK

Com ja hem esmentat anteriorment, la vida de les neurones depèn del balanç de la integració de les senyals de vida i de mort que rep. Moltes vies de transducció de senyals cooperen i participen en aquest procés. Estudis recents han establert que les cinases activades per mitògens (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*) juguen un paper regulador important en aquest procés. Les cascades de les MAPK existeixen en tots els eucariotes i participen en diferents activitats cel·lulars, com la mitosi, el programa de mort cel·lular, la motilitat i el metabolisme. Les MAPK fosforilen específicament serines i treonines. Entre els substrats de les MAPK es troben factors de transcripció, fosfolipases, altres cinases, proteïnes associades al citoesquelet i receptors de membrana [revisat a (Davis, 2000); (Johnson and Lapadat, 2002) i (Gallo and Johnson, 2002)].

Les MAPK formen part d'una cascada de fosforilacions que es compon de tres tipus de cinases que s'activen seqüencialment, i de la mateixa manera que els seus substrats, les MAPK es regulen mitjançant fosforilació (Ray and Sturgill, 1988). En aquesta cascada trobem que les MAPK serveixen de substrat a les cinases de les MAPK (MKK, *MAPK kinases*), que a la vegada són fosforilades i activades per les cinases de les MKK (MKKK, *MAPK kinase kinases*) [revisat a (Gallo and Johnson, 2002)].

En mamífers s'han identificat tres subfamílies dins de les MAPK: ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK i p38. Generalment, l'activació de les formes d'ERK indueix respostes de supervivència, mentre que l'activació tant de JNK com de p38 produeix mort cel·lular [revisat a (Harper and LoGrasso, 2001)].

- 3.2.1.- ERK

ERK1 i ERK 2 es troben àmpliament expressades i estan involucrades en la regulació de la meiosi i la mitosi i en cèl·lules diferenciades participarien en processos com l'aprenentatge i la memòria en el sistema nerviós central. Diferents estímuls com factors de creixement, citocines i infeccions víriques, entre d'altres, poden activar les vies d'ERK 1 i ERK2. La cascada Raf/MEK/ERK es troba altament conservada i segons el tipus cel·lular i l'estímul, la via s'ha implicat en proliferació, diferenciació, supervivència i migració [revisat a (Johnson and Lapadat, 2002)].

- 3.2.2.- JNK

Les JNK es van aïllar i caracteritzar com cinases activades per estrès, SAPK (*stress-activated MAP kinases*), degut a la seva activació en resposta a la inhibició de la síntesi proteica (Kyriakis et al., 1994). Més tard es va veure que uneixen i fosforilen la proteïna d'unió a ADN c-Jun i incrementen així la seva activitat transcripcional. c-Jun és un component del complex de transcripció AP-1, que és un important regulador de l'expressió gènica.

Les JNK són codificades per 3 gens, els gens *jnk1* i *jnk2* s'expressen de manera ubíqua, mentre que l'expressió de *jnk3* es troba restringida majoritàriament al cervell. Aquests tres gens donen lloc a deu isoformes (Gupta et al., 1996).

Les JNK s'activen per fosforilació en treonina i tirosina per l'MKK4 i l'MKK7 (Tournier et al., 2001). La cinasa MKK7 s'activa principalment per citocines com TNF i IL-1, mentre que MKK4 s'activa sobretot per estrès ambiental i també pot activar a p38 [revisat a (Davis, 2000)]. Assajos d'immunofluorescència demostren la presència d'MKK4 i MKK7 a citoplasma i a nucli (Tournier et al., 1999), el que indicaria que JNK podria ser activada tant a nucli com a citoplasma.

La regulació de la via de JNK és molt complexa i està influenciada per moltes MKKK, entre les que es troben membres del grup MEKK i del grup de les MLK (*mixed-lineage protein kinases*), entre d'altres. Aquesta gran diversitat d'MKKK permet que un gran nombre d'estímuls, com les citocines o diferents tipus d'estrès, activin aquesta via [revisat a (Johnson and Lapadat, 2002) i (Ip and Davis, 1998)].

Un altre nivell de control addicional ve proporcionat per les JIP (*JNK interacting proteins*), que són proteïnes d'andamiatge que indueixen la transducció de senyals a través de la via de les MKKK, MKK i JNK probablement perquè segresten totes les cinases necessàries per tal de que el procés sigui més eficient (Whitmarsh et al., 1998).

Les JNK són importants en el control de la proliferació i de la mort cel·lular programada (Tournier et al., 2000), tot i que també s'han implicat en la senyalització de supervivència [revisat a (Ip and Davis, 1998)]. Nombroses evidències indiquen que JNK

funciona com una cinasa pro-apoptòtica [(Davis, 2000) i (Lin, 2003)]. Estudis bioquímics mostren que l'apoptosi induïda per la retirada d'NGF en la línia cel·lular de feocromocitoma de rata PC-12 és bloquejada quan s'inhibeix la via de JNK, mentre que l'activació de la via de JNK expressant un MEKK1 constitutivament actiu indueix apoptosi en aquestes cèl·lules [(Minden et al., 1994); (Xia et al., 1995); (Le Niculescu et al., 1999)].

En diferents experiments amb ratolins deficients de JNK es va veure que JNK també té un paper pro-apoptòtic en les neurones (Yang et al., 1997) i (Bruckner et al., 2001). Per diferents experiments amb anticossos contra c-Jun i amb el mutant truncat de c-Jun semblaria que el paper de JNK en l'apoptosi de les neurones estaria mediat per c-Jun (Ham et al., 1995). A part de c-Jun, s'han descrit altres substrats de JNK, com la proteïna supressora de tumors p53 i el factor de transcripció c-Myc [revisat a (Davis, 2000)].

Tot i que està establert que JNK contribueix a l'apoptosi induïda per una gran diversitat d'estímuls, no està clar que l'apoptosi sigui la única conseqüència funcional de la seva activació [revisat a (Davis, 2000)]. Molts estímuls que activen JNK no donen lloc a apoptosi, això es deu, en part, a que l'apoptosi dependent de JNK és bloquejada quan s'activen vies de senyalització de supervivència com NF- κ B, Akt/PKB i ERK (Xia et al., 1995). L'absència d'apoptosi després d'activar JNK sembla correlacionar amb el curs temporal de l'activació de JNK. Així, una activació sostinguda de JNK, però no la transitòria, estaria associada amb apoptosi (Chen and Tan, 2000). Per contra, les cèl·lules interpretarien una activació transitòria de JNK com una senyal de supervivència en funció de l'estat d'activació d'altres vies de senyalització dins de la cèl·lula.

La via de transducció de senyals de JNK s'ha implicat en diferents condicions patològiques, com el càncer i el dany per hipòxia-isquèmia, i en algunes malalties neurodegeneratives (Yang et al., 1997). Estudis recents han demostrat que JNK també jugaria un paper important en altres formes de mort cel·lular, com l'autofàgia i la necrosi [revisat a (Weston and Davis, 2002)].

- **3.2.3.- p38**

Hi ha quatre isoformes de p38: α [(Han et al., 1994) i (Lee et al., 1994b)], β (Jiang et al., 1996), γ (Li et al., 1996) i δ [(Jiang et al., 1997) i (Wang et al., 1997)]. La p38 α és la millor caracteritzada i la que s'expressa en la major part de tipus cel·lulars. Les dues úniques isoformes que s'expressen en cervell són la α i la β .

L'activació de p38, com passa amb JNK, segueix una cascada de proteïnes cinases on p38 seria el substrat de les MKK. MKK6, MKK4, MKK3 i MKK3b fosforilen p38 en la treonina i tirosina que es troben en el bucle d'activació. Igual que amb JNK, les MKKK, que es trobarien per sobre de les MKK en la cascada de fosforilacions, són moltes i és probable que aquestes cinases siguin dependents d'estímul i tipus cel·lular [revisat a (Harper and LoGrasso, 2001)].

S'han descrit diferents substrats per p38, entre els que trobem els factors de transcripció ATF2 i PHAS-I i les cinases MAPKAP2, MAPKAP3 i MAPKAP5. Les p38 regulen l'expressió de moltes citocines i s'activen en cèl·lules del sistema immunitari com a part de la resposta immune. També s'activen per altres estímuls com hormones, el xoc osmòtic o la retirada d'NGF. Com passa amb l'activació de JNK, semblaria que diferents estímuls afectarien de forma diferent a diferents tipus cel·lulars [revisat a (Johnson and Lapadat, 2002)].

L'evidència més forta de que la p38 té un paper en la mort cel·lular ve d'estudis fets en cèl·lules PC12, on la retirada d'NGF indueix l'activació de p38 i JNK i provoca un increment de la mort apoptòtica (Xia et al., 1995). A més, hi ha diferents estudis fets amb inhibidors de p38 que recolzen el seu paper en la mort cel·lular [revisat a (Harper and LoGrasso, 2001)].

3.3.- GSK-3

A més de la participació de p38 i JNK en la mort cel·lular, en els últims anys s'ha reconegut la influència de la GSK-3 en processos de mort programada [revisat a (Grimes and Jope, 2001) i (Beurel and Jope, 2006)].

GSK3 va ser identificada i anomenada per la seva capacitat de fosforilar i, com a conseqüència, inactivar la glicogen sintasa, un pas essencial en el metabolisme del glicogen. Actualment, se sap que aquest enzim està implicat en altres processos cel·lulars, com són la determinació del destí cel·lular en el desenvolupament, el control de la transcripció gènica i, en mamífers, els processos d'oncogènesi i neurodegeneració [revisat a (Woodgett, 2001)].

Existeixen dues isoformes de GSK-3, GSK-3 α , d'uns 51kDa, i GSK-3 β , d'aproximadament 47kDa [(Woodgett, 1990;Woodgett, 1991)]. Es desconeixen les funcions específiques de les dues isoformes, però ha estat GSK-3 β la que s'ha estudiat en més detall en diferents models experimentals.

GSK-3 s'expressa en tots els teixits, amb nivells d'expressió particularment alts en cervell (Woodgett, 1990). En un estudi realitzat en rata es va demostrar que, durant el desenvolupament embrionari del cervell, GSK-3 β és més abundant en neurones que en astròcits i que els seus nivells disminueixen a partir del dia post-natal 20, moment que correlaciona temporalment amb el final del procés d'extensió neurítica i formació de sinapsis (Leroy and Brion, 1999).

- **3.3.1.- Regulació de GSK-3**

GSK-3 és una serina-treonina cinasa que, a diferència de la majoria de cinases, es regula principalment per inactivació, ja que en les cèl·lules en estat basal es troba activa. Quan la cèl·lula rep un estímul, es disparen mecanismes intracel·lulars que inactiven GSK-3 [revisat a (Woodgett, 2001)].

L'activitat de GSK-3 es troba regulada per diferents mecanismes com són la fosforilació en serina, que resulta en la inhibició de l'enzim; la fosforilació en tirosina, que indueix l'activació de GSK-3; per la formació de complexos proteics i per la seva localització intracel·lular.

La reducció d'activitat de GSK-3 β per fosforilació en serina-9 es produeix a través de diferents cinases, entre les que es troben la cinasa AKT, algunes isoformes de la proteïna cinasa C i la cinasa dependent d'AMP cíclic. Diferents estímuls com IGF-1, insulina, NGF i l'estrès cel·lular poden induir inhibició de GSK-3 β a través de l'activació d'AKT [revisat a (Grimes and Jope, 2001)] (Figura 2).

Al contrari que amb la fosforilació en serina, la fosforilació de GSK-3 β en tirosina 216 produeix un increment de la seva activitat (Hughes et al., 1993). Estudis realitzats en *Dictyostelium* han demostrat que l'activació de GSK-3 β en tirosina es produiria per l'acció de la cinasa Zak1 [revisat a (Woodgett, 2001)]. Altres estudis indiquen que Fyn, un membre de les tirosina cinases de la família d'src, fosforila directament GSK-3 β activant-la [(Lesort et al., 1999)]. Recentment s'ha vist que un increment en els nivells de calci intracel·lular també estimula l'activitat de GSK-3 β per fosforilació en tirosina 216 (Hartigan and Johnson, 1999) (Figura 2).

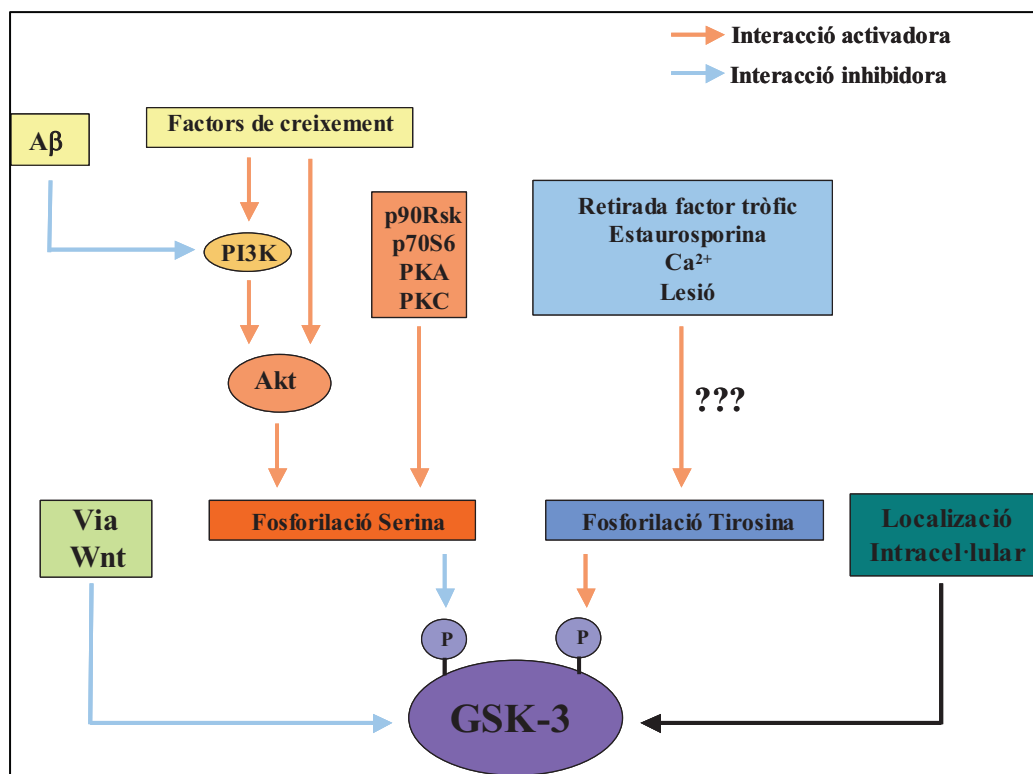


Figura 2. Mecanismes que regulen l'activitat de GSK-3 mitjançant la seva fosforilació en serina i en tirosina.

S'han identificat diferents proteïnes que regulen l'activitat de GSK-3 mitjançant la formació de complexos, les més estudiades formen part del trajecte de senyalització de Wnt (Figura 3). Breument, la unió de Wnt al receptor Frizzled activa la proteïna Dishevelled (Dsh) que s'encarrega d'inactivar un complex multiproteic a nivell citoplasmàtic format per GSK-3, β -catenina, Axina i APC. L'activació de Dsh a la vegada afavoreix la unió de la GBP (*GSK-3 binding protein*) al complex i d'aquesta manera s'inactiva GSK-3. Com a conseqüència, es bloqueja la fosforilació de β -catenina induïda per GSK-3 i s'estabilitzen els seus nivells. Aquest increment de β -catenina citoplasmàtica indueix la seva translocació al nucli on activa la transcripció gènica a través de la seva unió a TCF/LEF. En absència del lligand Wnt, GSK-3 fosforila β -catenina marcant-la per a ser ubiquïtinitzada i degradada per la via del proteasoma [revisat a (Grimes and Jope, 2001)] (Figura 3).

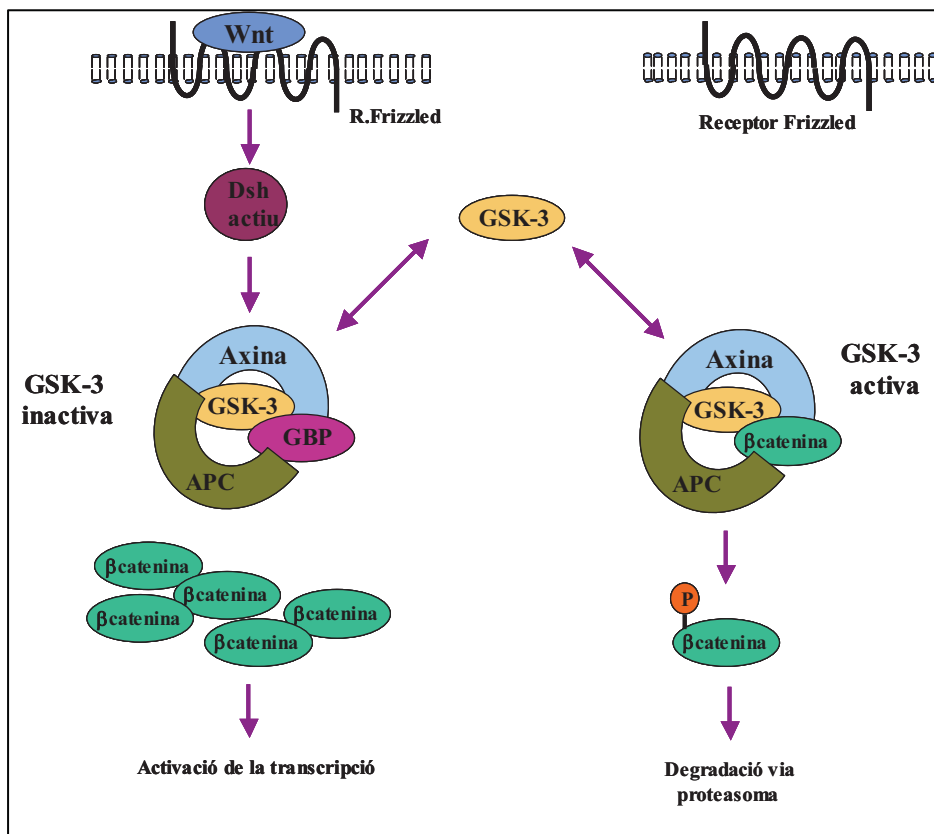


Figura 3. Regulació de l'activitat de GSK-3 mitjançant la formació de complexos.

A més de la fosforilació i la formació de complexos proteics, GSK-3 també pot ser regulada per la seva localització subcel·lular (Bijur and Jope, 2003). GSK-3 β es

troba principalment al citosol, però també està present a nucli [(Bijur and Jope, 2001) i (Diehl et al., 1998)] i mitocòndria (Hoshi et al., 1996). Els resultats obtinguts pel grup de Jope indiquen que tot i que la població majoritària de GSK-3 β es troba en el citosol, aquesta és relativament inactiva en comparació amb les poblacions més petites que hi ha a nucli i mitocòndria. A més, aquestes poblacions que es troben a nucli i mitocòndria són més susceptibles a l'activació per estímuls apoptòtics que la GSK-3 citosòlica (Bijur and Jope, 2003).

- **3.3.2.- Què regula GSK-3?**

GSK-3 fosforila diferents tipus de substrats i d'aquesta manera està implicada en molts processos diferents, com són la plasticitat neuronal, el metabolisme, l'expressió gènica i la supervivència cel·lular [revisat a (Beurel and Jope, 2006; Grimes and Jope, 2001)]. Els substrats de GSK-3 es poden classificar en quatre grans categories (Figura 4). En primer lloc, regula nombrosos enzims que participen en el metabolisme com la glicogen sintasa (GS, *glycogen synthase*), que s'inhibeix al ser fosforilada per GSK-3. En segon lloc, GSK-3 fosforila proteïnes que contribueixen a l'estructura de la cèl·lula, com les proteïnes associades a microtúbuls, MAP1 i MAP2, i tau. En tercer lloc, GSK-3 és un regulador clau de diferents factors de transcripció com AP-1 (*Activator protein-1*), CREB (*Cyclic AMP response element binding protein*), Myc, NF- κ B i β -catenina [revisat a (Grimes and Jope, 2001)]. I per últim, recentment s'ha descrit la seva participació en la regulació del programa de mort [revisat a (Beurel and Jope, 2006)]. S'ha vist que GSK-3 és pro-apoptòtica quan l'estímul que indueix apoptosi activa la via intrínseca del programa de mort, en canvi, GSK-3 és anti-apoptòtica quan s'estimulen els receptors de mort que activen la via extrínseca de la PCD [revisat a (Beurel and Jope, 2006)] (Figura 4).

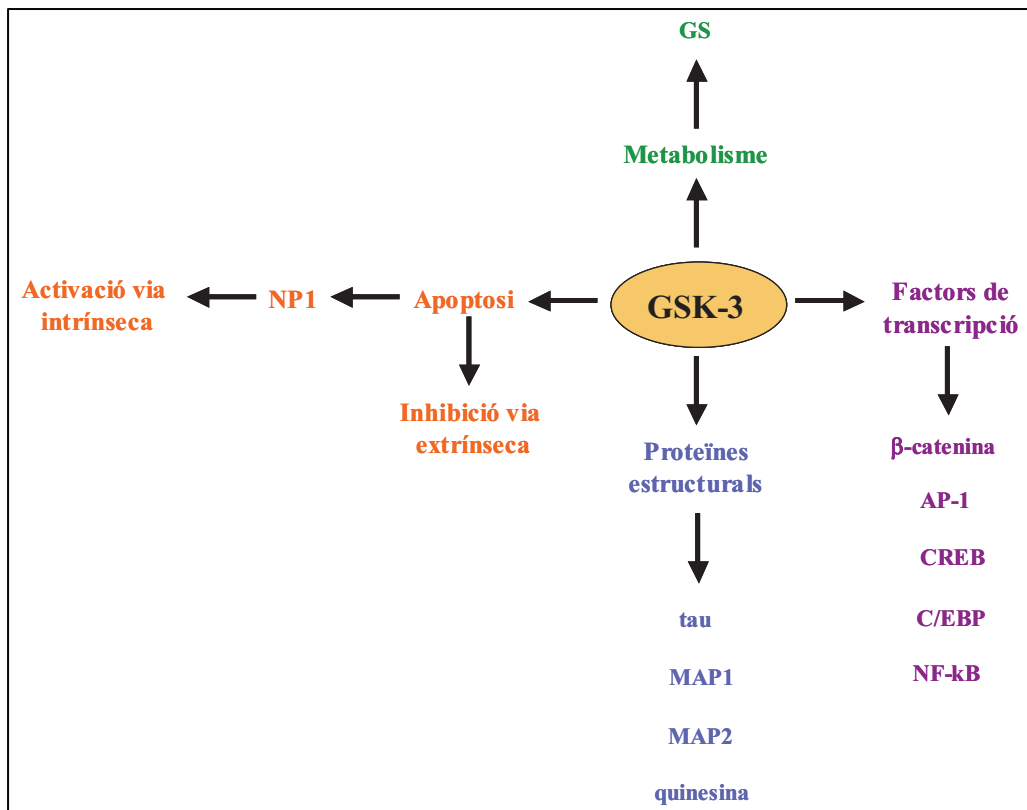


Figura 4. Substrats de GSK-3

3.4.- Paper de les vies de senyalització intracel·lular en la regulació de NP1

Per tal de prevenir el procés de mort neuronal es poden utilitzar principalment dues estratègies, per una banda activar les vies de senyalització de vida activades per neurotrofines, que bloquegen el programa apoptòtic a través de mecanismes dependents o independents de transcripció, o per altra banda, bloquejar els senyals que activen el programa de mort. El nostre treball va anar dirigit a analitzar si cadascuna d'aquestes estratègies per separat pot mantenir a llarg termini la supervivència de les cèl·lules granulars de cerebel. Donat que la NP1 es sobreexpressa abans de que es produeixin els canvis morfològics característics del procés de mort apoptòtica induïda per privació de potassi (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001), l'objectiu principal fou identificar quina de les vies senyalització que participen en el control de la mort i supervivència neuronal són les responsables de l'increment d'expressió de NP1 (Enguita et al., 2005).

Tant l'activació per IGF-1 de la via PI-3-K/AKT, via que senyalitza supervivència, com el bloqueig farmacològic de la via de la JNK, via que senyalitza mort i s'activa en

resposta a l'estrès, protegeixen de la mort induïda per privació potassi (Enguita et al., 2005). No obstant, cap d'aquests tractaments neuroprotectors impedeix la sobreexpressió de NP1 induïda per la privació de potassi, indicant que la privació de potassi activa vies de senyalització de mort cel·lular addicionals. Una observació molt rellevant es que la neuroprotecció que produeixen tant el IGF com el bloqueig de la via JNK, es transitòria. Aquests resultats suggerien que la privació de potassi, activa una via de senyalització de mort que regula de forma específica l'expressió de NP1 de forma independent als trajectes de senyalització de PI-3-K/AKT i JNK (Enguita et al., 2005).

Per identificar aquesta via de senyalització associada a NP1 es varen estudiar altres vies de senyalització de mort. La cascada de senyalització p38MAPK, és una altra via que senyalitza mort. La reducció de l'activitat d'aquesta cinasa mitjançant la inhibició de la seva fosforilació, no bloqueja la mort neuronal ni inhibeix la sobreexpressió de NP1 que s'indueix per privació de potassi. Per altra banda, GSK-3 és una cinasa que fosforila proteïnes amb residus de serina o treonina i hi ha evidències que indiquen que té un efecte pro-apoptòtic. Com que ni l'activació de trajectes de senyalització de supervivència, com el de PI3K/AKT, ni la inhibició de trajectes de senyalització de mort, com el de p38 o el de JNK, varen tenir cap efecte sobre l'expressió de NP1 induïda per privació de potassi (Enguita et al., 2005), els experiments següents del nostre laboratori es varen adreçar a investigar la possibilitat de que GSK-3 reguli l'expressió de NP1.

Els resultats obtinguts varen demostrar que efectivament, la reducció de l'activitat de GSK-3 bloqueja completament la sobreexpressió de NP1 induïda per la privació de potassi i proporciona protecció transitòria de la mort cel·lular (Enguita et al., 2005). A més, el bloqueig farmacològic simultani de la via de JNK i de l'activitat de GSK-3 proporciona protecció a llarg termini de la mort induïda per privació de potassi en cèl·lules granulars de cerebel. Aquests resultats mostren que les vies de senyalització de JNK i GSK-3/NP1 són les principals rutes per les quals la privació de potassi activa el programa intrínsec de mort cel·lular, i que la sobreexpressió de NP1 està regulada per l'activitat de GSK-3 independentment de les vies de PI-3-K/AKT i JNK (Enguita et al., 2005) (Figura 4).

4.- LA FAMÍLIA DE LES PENTRAXINES

Les pentraxines es van anomenar així originàriament degut a la seva estructura, que consisteix en cinc subunitats idèntiques unides de manera no-covalent en simetria radial pentamèrica, de forma similar a la observada en la proteïna reactiva C humana (Osmand et al., 1977) (Figura 5).

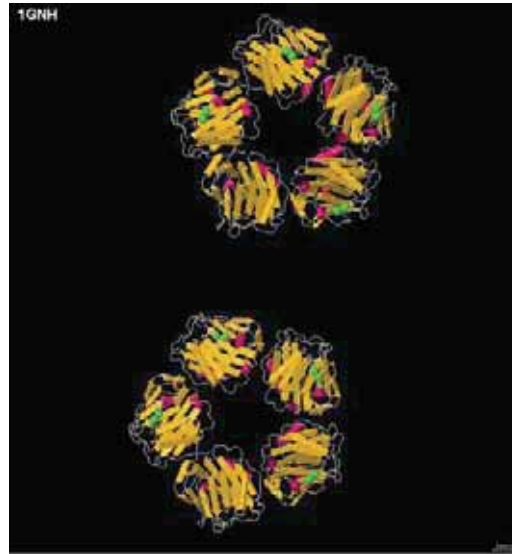


Figura 5. Estructura de la proteïna C reactiva humana unida a Ca^{2+} . Les hèlix- α estan representades com cilindres roses, i les làmines- β estan representades com taulons grocs. Les fletxes assenyalen cap als terminals carboxil. Els ions calci estan representats com esferes de color verd.

La família de les pentraxines es divideix en dues subfamílies o classes estructurals segons el seu tamany: la subfamília de les pentraxines clàssiques o ‘curtes’ (d’uns 25 kDa) i la subfamília de les pentraxines ‘llargues’ (de 40-50 kDa), descrites més recentment. La seqüència de les pentraxines clàssiques es troba altament conservada entre els vertebrats. Una altra característica de les pentraxines clàssiques és que són lectines dependents de calci (Goodman et al., 1996). Existeix molta informació sobre les pentraxines curtes, que van ser descrites per primer cop a la dècada dels anys 30 com a proteïnes del sistema immunitari innat. En canvi, de les pentraxines llargues, que s’expressen en d’altres òrgans, no hi ha tanta informació. El seu primer membre, anomenat TSG-14 o PTX3, es va descobrir fa només uns anys.

4.1.- Les Pentraxines curtes

Pertanyen a aquesta subfamília la proteïna C reactiva (*C-reactive protein*, CRP) i la proteïna amiloidea P (*Serum amyloid P component*, SAP). La CRP i la SAP són proteïnes sèriques d'uns 25 kDa produïdes majoritàriament pels hepatòcits en resposta a un dany o una infecció com a part de la fase aguda de la resposta immune (Gewurz et al., 1995; Steel and Whitehead, 1994). L'expressió d'aquests gens està regulada per citocines, especialment per la IL-1, el TNF (*tumor necrosis factor*, factor de necrosi tumoral) i la IL-6, i per glucocorticoids (Steel and Whitehead, 1994). La CRP i la SAP comparteixen aproximadament el 51% de la seva seqüència d'aminoàcids i formen pentàmers en condicions fisiològiques (Emsley et al., 1994).

La CRP va ser identificada per la seva capacitat de precipitar, en presència de calci, el polisacàrid C del pneumococ [revisat a (Goodman et al., 1996)] i la seva presència en el plasma és un indicador de que s'està produint una inflamació sistèmica (Steel and Whitehead, 1994).

La SAP és la glicoproteïna precursora de la proteïna amiloidea P que es troba en les lesions tissulars causada per les diverses formes d'amiloidosi, incloent les plaques senils de la malaltia d'Alzheimer (Baltz et al., 1986).

Les principals funcions fisiològiques o patofisiològiques de SAP i CRP encara no es coneixen, però es creu que les pentraxines curtes juguen un paper important en la unió i l'eliminació de les restes cel·lulars, derivades de l'hoste o del patogen, que es produeixen com a conseqüència d'un procés d'inflamació aguda com a part de la resposta immune innata (Goodman et al., 1996). Altres funcions documentades de la SAP i la CRP inclouen la regulació de la producció de citocines i la potenciació de les activitats tumoricides dels monòcits i els macròfags [(Zahedi and Mortensen, 1986);(Mortensen, 1994);(Galve-de Rochemonteix et al., 1993)]. Més recentment, s'ha demostrat la presència de CRP i SAP en els cabdells neurofibril·lars presents a la malaltia d'Alzheimer (Kalaria et al., 1996), a més s'ha vist que la seva expressió està incrementada en el cervell de pacients diagnosticats d'Alzheimer (Yasojima et al., 2000). Aquests autors suggereixen que l'aparició d'aquestes proteïnes en el malalts d'Alzheimer, així com en altres malalties com l'arterioesclerosi, podria representar un

procés auto-destructiu causat per una alteració en el control de la resposta immune innata.

4.2.- Les Pentraxines llargues

Les pentraxines llargues tenen aproximadament el doble de tamany que la CRP i la SAP. Dins d'aquesta subfamília s'inclouen el TSG-14 (*TNF-stimulated gene 14*, gen 14 estimulat per TNF)/pentraxina 3 (PTX3), l'apexina/p50, la XL-PXN1, la NP1, la NP2 i el NPR.

La homologia entre les pentraxines llargues i les curtes es limita a la meitat carboxi-terminal de les proteïnes més llargues, suggerint que aquestes últimes són resultat de fusions de dominis amino-terminals nous amb un domini pentraxina ancestral (Goodman et al., 1996).

- 4.2.1.- TSG-14/PTX3

La TSG-14 va ser la primera pentraxina llarga descrita i és la que està millor caracteritzada. Es va aïllar en el laboratori de Goodman i col·laboradors mentre intentaven aclarir els mecanismes moleculars subjacents a la gran quantitat d'accions del TNF- α mitjançant cribatge diferencial d'una llibreria de cADN de fibroblasts humans. D'aquesta manera es van aïllar vuit gens diferents que s'indueïen per TNF, d'entre els quals el TSG-14 va ser el més abundant (Lee et al., 1990).

Un gen pràcticament idèntic, el *ptx3*, que només es diferencia del *tsg-14* per un aminoàcid, es va clonar posteriorment a partir de cèl·lules endotelials en resposta a IL-1 (Breviario et al., 1992); (Introna et al., 1993).

El cADN de *tsg-14/ptx3* codifica per una proteïna de 381 aminoàcids que inclou una seqüència senyal de 17 aminoàcids. La proteïna 'madura', sense el pèptid senyal, té un pes molecular de 42 kDa, però, mitjançant la glicosilació que es produeix com a processament post-traducciona, es dona lloc a una glicoproteïna de secreció d'uns 50 kDa (Lee et al., 1994a). La síntesi de TSG-14/PTX3 s'indueix fortament a nivell transcripcional per les citocines inflammatòries com TNF i IL-1, i pel lipopolisacàrid

bacterià (LPS) en fibroblasts, cèl·lules endotelials, monòcits i macròfags (Introna et al., 1993);(Lee et al., 1994a).

- **4.2.2.- Apexina/p50**

Va ser clonada a principis de la dècada dels anys 90 simultàniament per dos grups que estudiaven la fusió entre l'òvul i l'espermatozoide, coneguda com reacció acrosòmica (Hardy et al., 1991);(Westbrook-Case et al., 1994). Aquesta nova proteïna de 425 aminoàcids, anomenada apexina o p50, es troba localitzada en el pol anterior dels espermatozoides del conill d'índies dins del compartiment acrosòmic. Anàlisi de *northern blot* van confirmar l'expressió de l'apexina en els testicles del conill d'índies. La seqüència de l'apexina és homòloga amb la resta de membres de la família en el domini pentraxina, el domini d'unió a calci i el domini d'unió a lligand (Goodman et al., 1996).

Tal i com succeeix amb la SAP i la CRP, l'apexina forma dímers i pentàmers en gels de poliacrilamida en absència d'agents reductors (Westbrook-Case et al., 1994).

- **4.2.3.- XL-PXN1**

Mentre tractaven de descobrir els orígens i l'evolució de les pentraxines, buscant homòlegs dels gens de la CRP i la SAP en organismes vertebrats no-mamífers, el grup de Seery, va trobar una pentraxina a *Xenopus laevis* que van anomenar XL-PXN1 (Seery et al., 1993). El gen de la XL-PXN1 codifica per una proteïna de 416 aminoàcids amb un pes molecular d'uns 50 kDa, amb una alta homologia amb la família de les pentraxines en la seva meitat carboxi-terminal. La homologia en la regió amino-terminal és molt dèbil, fet que fa que sigui la pentraxina llarga amb el domini amino-terminal més diferent (Goodman et al., 1996).

- **4.2.4.- NP1**

Al 1995 el grup d'Schlimgen va identificar per cromatografia d'alta afinitat, una glicoproteïna de secreció de 47 kDa que mostrava una elevada homologia amb la família de les pentraxines (Schlimgen et al., 1995). En ser el primer membre de la família de les pentraxines que s'expressa en sistema nerviós, la van anomenar

pentraxina neuronal 1 (NP1). La NP1 es va identificar i aïllar per la seva capacitat d'unir de manera calci-depenent la taipoxina, una toxina procedent del verí de la serp. La taipoxina és una potent toxina que actua a nivell pre-sinàptic impeding la transmissió neuromuscular ja que bloqueja el reciclatge de les vesícules sinàptiques. Mitjançant anàlisi de *Northern Blot* i d'hibridació *in situ* van demostrar l'existència d'alts nivells del missatger de la NP1 en cervell, amb els nivells més alts al cerebel i a la regió CA3 de l'hipocamp. Malgrat això, van trobar nivells molt baixos de la proteïna en extractes de cervell, cosa que van interpretar com que la NP1 tenia una vida mitja molt curta o una baixa taxa de traducció (Schlimgen et al., 1995).

Les cèl·lules glials no internalitzen la taipoxina i per això, són molt resistents als seus efectes citotòxics. Assaigs d'immunocitoquímica realitzats pel laboratori d'Schlimgen, suggereixen una recaptació glial de la NP1. El tractament de les cèl·lules glials amb NP1 recombinant i taipoxina provoca un increment de la mort cel·lular, resultats que indiquen que la NP1 intervé en la internalització de la toxina per part de les cèl·lules glials i suggereix l'existència d'un receptor per la NP1 en la superfície d'aquestes cèl·lules. A més, el grup d'Schlimgen va hipotetitzar que la NP1 podria mitjançar l'eliminació de restes sinàptiques, d'una manera similar a com ho fan la CRP i la SAP en zones on hi ha inflamació, i per tant estar implicada en la remodelació sinàptica (Schlimgen et al., 1995).

La homologia de la NP1 amb altres pentraxines suggereix que és una proteïna de secreció. Aquesta idea es veu reforçada pel fet de que la NP1 és glicosilada i té un pèptid senyal (Schlimgen et al., 1995). Per altra banda, la NP1 és una proteïna amb un extrem N-terminal que conté dominis anomenats super-enrotllats (*coiled-coil domains*), que són dominis d'interacció proteïna-proteïna. En l'extrem C-terminal hi ha la seqüència que codifica per un domini pentraxina [(Hsu and Perin, 1995);(Schlimgen et al., 1995); (Tsui et al., 1996)] (Figura 6).

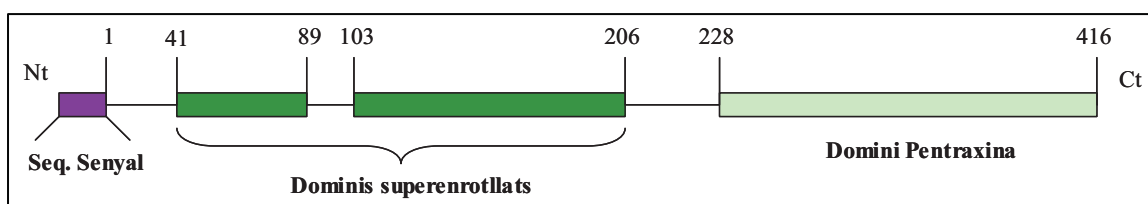


Figura 6. Estructura dels dominis de la NP1

La funció de la NP1 encara no es coneix. Per estudis previs del nostre laboratori se sap que està implicada en el programa de mort neuronal induït per retirada d'activitat en les cèl·lules granulars de cerebel [(DeGregorio-Rocasolano et al., 2001);(Enguita et al., 2005)]. Altres estudis recents indiquen que la NP1 es troba a les sinapsis excitadores, tant als compartiments pre-sinàptics com als post-sinàptics i tal i com s'explicarà més endavant, semblen relacionar a la NP1, junt amb la NP2, amb l'agrupació de receptors AMPA a la sinapsi (Xu et al., 2003).

- 4.2.5.- NP2

En un intent per aïllar l'homòleg humà de la NP1 i identificar altres gens de la família de les pentraxines neuronals, el grup de Perin i col·laboradors va fer cribatge de llibreries de cDNA genòmic i de cervell humà sota condicions de baixa astringència i es va trobar la segona pentraxina expressada en teixit nerviós, que es va anomenar pentraxina neuronal 2 (NP2) (Hsu and Perin, 1995).

La seqüència aminoacídica de la NP2 conté un pèptid senyal a la regió amino-terminal i 3 llocs potencials de N-glicosilació, suggerint que la NP2 és una glicoproteïna de secreció. La NP2 comparteix un 54% d'homologia amb la NP1 i un 80% amb l'apexina/p50, indicant que podria ser un homòleg humà de la proteïna acrosòmica del conill d'índies (Goodman et al., 1996) (Figura 7). L'expressió de NP2 és molt alta als testicles, però al contrari que l'apexina, també s'expressa en cervell, pàncreas, fetge, cor i múscul esquelètic.

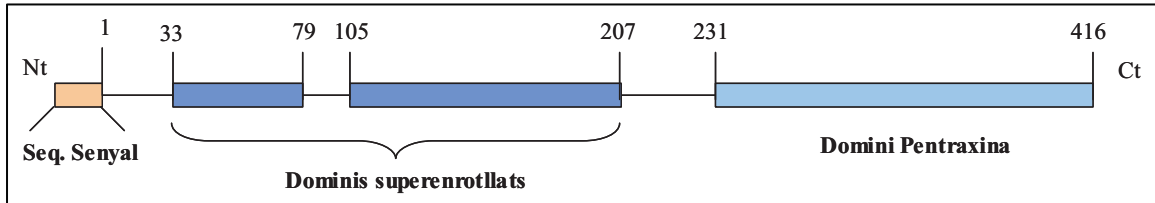


Figura 7. Estructura dels dominis de la NP2

Primerament, el grup de Perin va observar que la NP2 no s'unia a la taipoxina (Hsu and Perin, 1995). El fet de que la NP2 s'expressi en molts teixits diferents, junt amb el fet de que no s'uneixi a la taipoxina, suggereix que té una funció diferent a la NP1 (Goodman et al., 1996). Més tard, però, el laboratori de Perin va buscar altres proteïnes que s'unissin a la taipoxina i va trobar, que la NP2, igual que la NP1, es trobava enriquida en aquestes columnes (Dodds et al., 1997), tot i que no queda clar si s'uneix directament a la taipoxina o si ho fa a través de la NP1.

Paral·lelament al treball del grup d'en Perin, un altre grup va clonar la NP2 a partir de cèl·lules hipocampals de rata i va trobar que la seva expressió s'indueïa quan s'incrementava l'activitat sinàptica, per això la van anomenar NARP (*neuronal activity-related pentraxin*, pentraxina neuronal dependent d'activitat) (Tsui et al., 1996). Aquest grup va demostrar que la NP2 és una glicoproteïna de secreció d'uns 47 kDa amb les propietats bioquímiques d'una lectina dependent de calci. Estudis funcionals indiquen que la NP2 promou la migració neuronal i el creixement dendrític de les neurones en cultius d'explants corticals, de manera comparable a com ho fan les neurotrofines i els factors de creixement. Aquest efecte no està acompanyat per un creixement i migració de les cèl·lules glials, el que suggereix que es produeix principalment en neurones.

L'ARN missatger de NP2 s'indueix fortament 4 hores després d'un estímul sinàptic d'alta freqüència que produeix LTP (Tsui et al., 1996). Així, a l'hipocamp, la inducció sinàptica de la NP2 està associada amb un fort increment de l'activitat neuronal i la producció subseqüent d'LTP. Aquest efecte és dependent de l'activació dels receptors d'NMDA, ja que si es tracten les rates amb l'antagonista no-competitiu del receptor d'NMDA (MK-801), es bloqueja tant l'increment del missatger de NP2 com de l'LTP (Tsui et al., 1996). En aquest paradigma, la inducció de l'ARN missatger de la NP2,

com la inducció d'altres IEGs (*Immediate early genes*, gens d'expressió immediata), no està lligada només a l'activitat sinàptica, sinó a formes específiques d'activitat relacionada amb la funció dels receptors d'NMDA (Worley et al., 1990) i (Worley et al., 1993). Degut a que la NP2 es regula ràpidament per l'activitat sinàptica, les observacions d'aquest grup suggereixen un paper clau de la NP2 en el desenvolupament neural i la plasticitat neuronal dependent d'activitat (Tsui et al., 1996).

Altres estudis del grup de Worley i col·laboradors mostren que la NP2 es troba enriquida en sinapsi excitadores de neurones de l'hipocamp i de la medul·la espinal (O'Brien et al., 1999). La sobreexpressió de NP2 recombinant en neurones espinals en cultiu incrementa el nombre de les sinapsi excitadores, però no de les inhibidores, i es troba present tant a la superfície pre-sinàptica com a la post-sinàptica. En HEK 293T transfectades amb NP2, aquesta pentraxina interacciona amb ella mateixa, formant grans agrupacions a la superfície cel·lular. Aquestes agrupacions de NP2 s'uneixen a determinades subunitats del receptor AMPA, GluR1-3, induint d'aquesta manera l'agregació d'aquest tipus de receptors a la sinapsi (O'Brien et al., 1999). La NP2 és una proteïna extracel·lular sense dominis PDZ (*PSD-95*, *discs large* i *zona occludens 1*), que són dominis d'interacció proteïna-proteïna que determinen l'organització de proteïnes a la membrana post-sinàptica de les sinapsis excitadores (Kim and Sheng, 2004). Al no tenir aquests dominis, la NP2 no té accés als dominis d'unió a PDZ intracel·lulars de les subunitats dels receptors AMPA, el que suggereix que si interacciona directament amb aquests receptors, ho fa mitjançant els seus dominis extracel·lulars. La NP2, igual que la NP1, té un domini super-enrollat en el seu extrem amino-terminal (Tsui et al., 1996) que conté 3 cisteïnes que segons el grup de Worley serien les responsables de les interaccions entre pentraxines. D'altra banda, l'extrem C-terminal seria el domini responsable de la interacció amb el receptor AMPA (Cho et al., 2008).

Tots aquests resultats suggereixen que la NP2 podria facilitar la formació de noves sinapsis excitadores i l'agregació dels receptors AMPA a sinapsis ja establertes. Com NP2 és un IEG regulat per activitat sinàptica, la seva expressió dinàmica proporciona un nou mecanisme de regulació de la sinaptogènesi dependent d'activitat i de la plasticitat sinàptica (O'Brien et al., 1999). Mitjançant la utilització d'un dominant negatiu de NP2 (una forma truncada de la NP2 en la que falta gran part de l'extrem C-terminal), el grup

d'en Worley ha demostrat que una funció de la NP2 és la d'agregar receptors AMPA a les sinapsis excitadores en neurones espinals. Tant la NP2 pre-sinàptica com la NP2 post-sinàptica contribueixen a aquest procés (O'Brien et al., 2002).

Altres estudis del grup d'en Baraban, indiquen que les neurones que expressen orexines, neuropèptids que s'expressen selectivament en un grup de neurones hipotalàmiques i tenen accions excitadores, presenten una elevada expressió d'NP2 (Reti et al., 2002). A més, van veure que un altre grup de neurones hipotalàmiques que expressen MCH (*melanin-concentrating hormone*, hormona concentradora de melanina) i que es creu que tenen efectes oposats a les del sistema orexina i per tant, accions inhibidores (Gao and van den Pol, 2001), expressen NP1. La localització complementària de la NP2 i la NP1 en neurones que expressen orexina i en neurones que expressen MCH indiquen que aquestes dues vies peptidèrgiques utilitzen les pentraxines neuronals com neuropèptids per mediar els seus efectes en les neurones diana (Reti et al., 2002).

Els estudis de localització de les pentraxines neuronals realitzats pel grup d'en Worley indiquen que la NP1 no es troba a les sinapsi inhibidores, i que co-localitza amb NP2 a les sinapsi excitadores en el cervell, trobant-se tant als compartiments pre-sinàptics com als post-sinàptics (Xu et al., 2003). NP1 i NP2 co-localitzen amb els receptors AMPA en la superfície cel·lular, però els agregats de NP1 són més petits que els de la NP2 i són també menys eficients en co-agregar els receptors AMPA que els de NP2 (Xu et al., 2003). El grup d'en Worley suggereix que una altra característica que diferencia la NP1 i la NP2 és que la primera s'expressa de manera constitutiva, mentre que la segona s'indueix (Xu et al., 2003). Però, resultats previs del nostre laboratori demostren clarament que la NP1 s'indueix quan disminueix l'activitat neuronal (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001); (Enguita et al., 2005).

- **4.2.6.- Receptor de les pentraxines neuronals (NPR)**

Mitjançant cromatografia d'alta afinitat d'extractes de cervell de rata en columnes de taipoxina s'obtenen majoritàriament dues proteïnes, la NP1 i la TCBP49 (*taipoxin-associated calcium-binding protein 49*, proteïna 49 d'unió a calci associada a la taipoxina) (Dodds et al., 1995). El grup de Perin suggereix que la NP1 s'uneix al

material sinàptic i és reclutada a un compartiment que conté la TCBP49 (Dodds et al., 1995;Schlimgen et al., 1995). També postulen que la NP1 permet la internalització de la taipoxina o del complex NP1-taipoxina, i que aquest reclutament juga un paper molt important en els mecanismes moleculars de la toxicitat de la taipoxina. Per tal d'identificar altres proteïnes implicades en aquesta via d'internalització, van realitzar cromatografies de proteïnes procedents de cervell de rata en columnes de taipoxina, TCBP49 recombinant i proteïnes de fusió de la NP1 i la NP2 amb la glutatió-S-transferasa (GST) (Dodds et al., 1997). D'aquesta manera van identificar i clonar la seqüència d'una proteïna, que varen anomenar *Neuronal pentraxin receptor* (NPR), que s'uneix fortament a les columnes amb taipoxina, TCBP49, NP1 i NP2.

El NPR és el primer membre de la família de les pentraxines que és una proteïna integral de membrana. El NPR va ser identificat com una proteïna transmembrana de tipus II sense domini intracel·lular (Dodds et al., 1997);(O'Brien et al., 1999). El NPR que va identificar el grup d'en Perin conté, respectivament, un 49% i un 48% d'homologia amb la seqüència d'aminoàcids de la NP1 i la NP2 (Figura 8). L'observació de que el missatger de NPR s'expressa en les mateixes regions neuronals on s'expressen aquestes dues pentraxines va fer pensar que la funció de NPR és la d'unir pentraxines (Dodds et al., 1997).

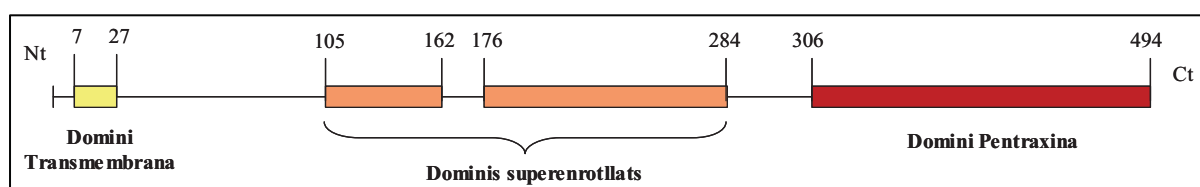


Figura 8. Estructura dels dominis del NPR

La hipòtesi del grup de Perin és que el NPR, la NP1, la NP2 i la TCBP49 estan involucrades en una via responsable del transport de material extracel·lular cap a la sinapsi. Aquesta via de recaptació, podria representar una nova via d'eliminació de restes sinàptiques a les neurones en processos de remodelació sinàptica (Dodds et al., 1997).

Estudis posteriors realitzats pel mateix grup d'en Perin per esbrinar les possibles interaccions entre les diferents pentraxines neuronals, indiquen que el NPR per si sol és

incapaç d'unir-se a la taipoxina i al TCBP49, mentre que la NP1 i la NP2 per si soles s'hi poden unir. A diferència d'aquestes 2 pentraxines, el NPR quan s'expressa individualment no és secretat. A més, no s'uneix a la taipoxina i no és capaç de formar multímers. El NPR, però, quan es troba en presència de NP1 i NP2 pot formar heteropentàmers amb elles i pot ser alliberat de la membrana cel·lular (Kirkpatrick et al., 2000).

De la mateixa manera que la NP1 i la NP2, el NPR té un domini N-terminal super-entrotllat i un domini pentraxina C-terminal (Xu et al., 2003), a més de l'extensió hidrofòbica al domini N-terminal que és el que fa que sigui una proteïna de membrana (Dodds et al., 1995).

- 4.2.6.1.- Pentraxina Neuronal amb Domini Chromo (NPCD)

El funcionament normal del sistema nerviós adult depèn de la projecció apropiada dels axons a les seves dianes durant el desenvolupament. La guia dels axons a les seves dianes es duu a terme a través de l'acció concertada d'una complexa varietat d'indicadors extrínsecs que interaccionen amb diferents receptors axonals (Chen and Bixby, 2005b). Dins del grup dels receptors de guia axonal es troben plexines i neuropilines, que uneixen semaforines, i els RPTPs (*transmembrane receptor-type tyrosine phosphatases*, tirosina-fosfatases de tipus receptor de membrana) entre d'altres (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996);(Bixby, 2000);(Johnson and Van Vactor, 2003). Com a mínim dues grans classes d'RPTPs, els de tipus IIa i els de tipus III, juguen papers importants en el desenvolupament del patró axonal durant l'embriogènesi (Johnson and Van Vactor, 2003). Dels 5 RPTPs de tipus III que hi ha en els vertebrats, només el PTPRO (*protein tyrosine phosphatase receptor type O*) s'ha implicat en el creixement i la guia axonal. El domini extracel·lular recombinant del PTPRO inhibeix el creixement neurític, col·lapsa els cons de creixement i és una senyal de repulsió per la guia dels axons retinals (Stepanek et al., 2001).

Per tal d'identificar els mecanismes de senyalització mitjançant els quals actuen els RPTPs de tipus III, el grup de Bixby va utilitzar el domini intracel·lular del PTPRO com a esquer en un assaig de doble híbrid en llevat (*yeast two-hybrid screen*). En aquest estudi van identificar un fragment del NPR com una proteïna que interacciona fortament amb aquest domini del PTPRO (Chen and Bixby, 2005b).

Després d'un anàlisi més exhaustiu de la seqüència genòmica del NPR, el grup d'en Bixby va descobrir que el cADN obtingut originalment pel grup d'en Perin no era complet, li faltava un exó en la part 5' que codifica un domini CHROMO i que el NPR era només una de les diverses formes de processament alternatiu. D'aquesta manera, el grup de Bixby va trobar isoformes de NPR que són intracel·lulars, i que corresponien per tant a un gen ampliat de NPR format pel domini pentraxina enllaçat a un domini cromo (modificador de la organització de la cromatina) amino-terminal (Figura 9). Al gen ampliat el van anomenar NPCD, per pentraxina neuronal amb domini cromo i van veure que la seva expressió es troba localitzada a les neurones i no es detecta a glia (Chen and Bixby, 2005b).

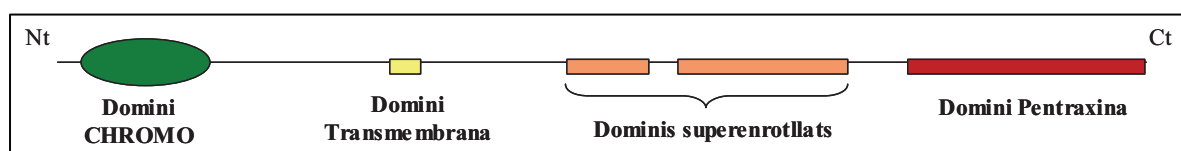


Figura 9. Estructura dels dominis del NPCD

Els dominis cromo són seqüències proteiques altament conservades que es van identificar primerament en varies proteïnes cromosòmiques. Són regions d'uns 50 aminoàcids d'interacció amb l'ADN, amb l'ARN i amb proteïnes de diferents tipus (Akhtar et al., 2000);(Li et al., 2002).

Segons els estudis del grup d'en Bixby (Chen and Bixby, 2005b), la interacció entre el NPR i el domini intracel·lular del PTPRO suggereix l'existència de formes intracel·lulars del NPR. Fins aquest moment s'havia postulat que el NPR, igual que les altres 2 pentraxines neuronals, NP1 i NP2, era una proteïna d'acció exclusivament extracel·lular (Dodds et al., 1997). Però al contrari, la interacció fisiològica entre el NPR i el domini intracel·lular del PTPRO que proposen Chen i col·laboradors suposa l'existència de variants citosòliques del NPR (Chen and Bixby, 2005b).

En concordança amb la hipòtesi postulada pel grup de Bixby, s'ha vist que la majoria de les isoformes del NPCD estan principalment localitzades al citosol i es troben sovint associades a la cara interna de la membrana plasmàtica neuronal, suggerint que tant les

proteïnes amb domini cromò com les pentraxines neuronals tenen funcions fisiològiques més extenses que les apreciades prèviament (Chen and Bixby, 2005b).

En uns altres estudis, el laboratori de Chen i Bixby va investigar la interacció entre les diverses formes del NPCD i el PTPRO i els possibles efectes d'aquesta interacció en la diferenciació neuronal. En aquests estudis, van trobar que les isoformes citoplasmàtiques del receptor de pentraxines interaccionen amb el domini catalític de PTPRO i que l'expressió de PTPRO és requerida per la localització apropiada del NPCD. Com el domini pentraxina és el domini d'unió a PTPRO, es preveu que la majoria de les isoformes del NPCD s'uneixen amb el PTPRO (Chen and Bixby, 2005a). A més, el NPCD és necessari pel creixement neurític induït per NGF en cèl·lules PC12, suggerint que aquest receptor de pentraxines estaria involucrat en la regulació del creixement axonal per PTPRO (Chen and Bixby, 2005a).

Aquests estudis proporcionen la primera evidència d'una pentraxina amb localització citoplasmàtica. El NPCD també és la primera proteïna que s'ha demostrat que s'uneix i que és defosforilada pel domini catalític PTPRO (Chen and Bixby, 2005a).

4.3.- Relació entre les pentraxines neuronals NP1 i NP2

Segons el grup de Worley i col·laboradors, la NP2, a més de tenir la capacitat d'agregar-se a ella mateixa formant multímers, és capaç també de formar heteromultímers amb la NP1 (Xu et al., 2003). Aquestes dues proteïnes s'uneixen de forma covalent per enllaços di-sulfur en complexos altament organitzats. La relació entre la quantitat de NP1 i la quantitat de NP2 no està clara, però el grup d'en Worley, després de que el nostre grup plantegés la hipòtesi que la NP1 i la NP2 tenen funcions oposades i que formen part d'un interruptor gènic (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001), va formular la hipòtesi que la relació NP2/NP1 en els complexos heteromultimèrics depèn dinàmicament de l'activitat neuronal i l'estat de desenvolupament de la neurona (Xu et al., 2003). Els resultats del grup d'en Worley demostren que la formació dels complexos heteromultimèrics depèn dels diferents dominis N-terminal super-enrotllats de la NP1 i la NP2, mentre que el seu domini carboxi-terminal, altament homòleg, participa en la interacció amb els receptors AMPA (Xu et al., 2003). En aquest estudi demostren que la NP1 és una proteïna sinàptica que

està físicament unida a NP2 en un complex resistent a SDS. NP1 és substancialment menys efectiva que NP2 en induir sinapsi excitadores. A més, la NP1 forma agrupacions més petites a la superfície cel·lular i és també menys eficient que la NP2 per induir agrupacions de receptors AMPA (Xu et al., 2003). Aquest efecte diferent entre la NP1 i la NP2 en formar agrupacions ve determinat per les característiques particulars de l'extrem amino-terminal de cada una d'elles. En canvi, en quant al domini pentraxina que és similar en la NP1 i la NP2 i que és el que intervé en la interacció amb els receptors AMPA, les dues presenten una activitat comparable. Quan les 2 pentraxines estan presents en els complexos multimèrics la seva activitat sinaptogènica és major que quan els complexos de pentraxines son homomultímers (Xu et al., 2003).

El model que el grup d'en Worley proposa per la funció d'aquestes pentraxines és el següent: NP1 i NP2 cooperen a l'hora d'induir l'agregació de receptors AMPA. Segons aquest grup, la NP1 s'expressa constitutivament en les neurones adultes i pot formar petites agrupacions a la superfície cel·lular que agregarien els receptors AMPA. L'expressió de NP2, que és induïda per activitat neuronal, resulta en la seva integració en els heteromultímers NP1/NP2. Aquests heteromultímers tenen major habilitat per agregar-se i per induir l'agregació de receptors AMPA a la sinapsi. D'aquesta manera la cèl·lula podria regular el grau d'agregació de receptors durant el desenvolupament i en resposta a un increment de l'activitat sinàptica (Xu et al., 2003) (Figura 10).

La NP1 s'expressa en grans quantitats en el cervell anterior en estadis postnats primers. Els seus nivells disminueixen unes 10 vegades entre els dies 6 i 11 postnats. Coincidint amb la reducció d'NP1 en el desenvolupament, hi ha un increment de NP2. El curs temporal de l'expressió d'aquestes dues proteïnes en el desenvolupament suggereix que la NP1 és més important en els estadis primers de formació de sinapsi (Xu et al., 2003). Les variacions de l'expressió d'aquestes 2 pentraxines en el desenvolupament coincideix amb la transició de la sinaptogènesi primerenca, que és independent d'activitat, a la sinaptogènesi més tardana que és dependent d'activitat. La observació de que l'expressió de NP1 continua alta en el cervell adult indicaria que els mecanismes independents d'activitat i dependents de secreció continuarien contribuint en el manteniment i remodelació de la sinapsi. Segons en Worley la NP1 seria independent d'activitat però dependent de secreció, en canvi la NP2 seria dependent d'activitat i dependent de secreció (Xu et al., 2003).

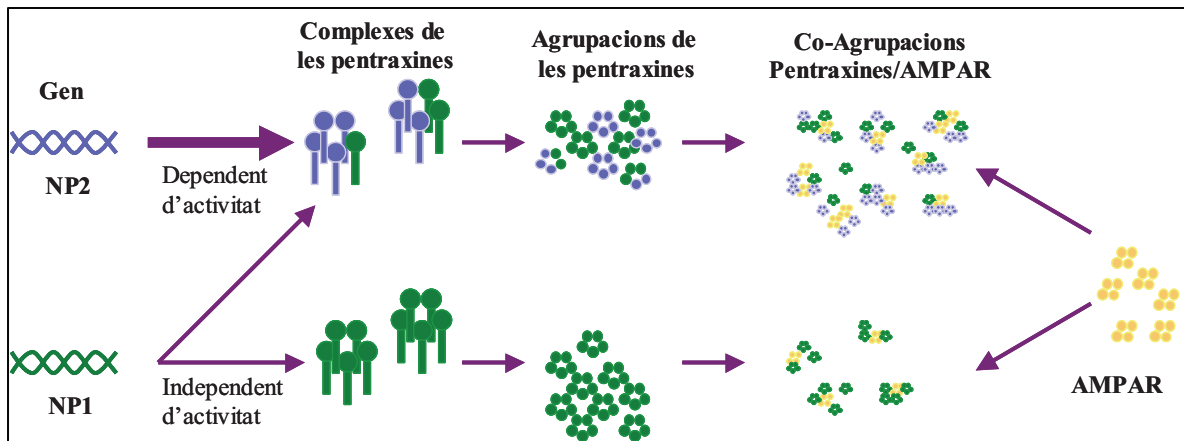


Figura 10. Model del grup de Worley i col·laboradors per la funció de les pentraxines (Xu et al., 2003). La NP1 i la NP2 comparteixen la funció d'agregar dels receptors AMPA (AMPA). Segons aquest grup la NP1 s'expressa de manera constitutiva en les neurones adultes i pot formar petits agregats a la superfície que poden agrupar els receptors AMPA. L'expressió de NP2 induïda per activitat induïx la integració de la NP2 en els heterocomplexes NP1/NP2 els quals tenen més capacitat d'agrupar receptors AMPA.

Aquests estudis proposen un model on NP2 pot regular l'activitat sinaptogènica latent de NP1 mitjançant la formació de complexos mixtes de pentraxines (Xu et al., 2003) (Figura 10). Per altra banda, els resultats presentats en aquesta tesi no recolzen la hipòtesi de que la NP1 sigui sinaptogènica, més aviat al contrari, ja que la sobreexpressió de NP1 mitjançant la infecció lentiviral induïx una reducció dels processos neurítics (Abad et al., 2006) (vegeu Figura 56 a la Discussió).

5.- LA MORT NEURONAL PROGRAMADA I ELS MECANISMES DE NEURODEGENERACIÓ EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER

5.1.- Característiques neuropatològiques de la malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer és una malaltia neurodegenerativa progressiva i es la demència més prevalent en la gent gran. Es caracteritza per l'aparició de dèficits en l'aprenentatge i la memòria amb pèrdua eventual d'altres funcions mentals. Els cervells dels malalts d'Alzheimer, tal i com va descriure el neuròleg alemany Alois Alzheimer ara ja fa 100 anys, presenten cabdells neurofibril·lars intracel·lulars i plaques. Des de llavors diferents estudis han demostrat que el component majoritari de les plaques és el pèptid β -amiloid ($A\beta$) i que els cabdells neurofibril·lars estan formats per la proteïna tau hiperfosforilada. Aquestes dues lesions es localitzen de manera preferent en el còrtex, l'hipocamp i l'amígdala [revisat a (Walsh and Selkoe, 2004)]. Però el procés mitjançant el qual es formen aquests agregats encara es desconeix.

- 5.1.1.- Les plaques neurítiques

Les plaques neurítiques estan formades per dipòsits d' $A\beta$ extracel·lular que es troben associats a axons i dendrites danyades. Les neurites distròfiques es troben tant entre les acumulacions d' $A\beta$ com envoltant-les. Aquestes neurites sovint es troben dilatades i amb formes tortuoses i presenten anomalies ultraestructurals com lisosomes engrandits, moltes mitocòndries i filaments. Aquestes plaques també es troben estretament associades a microglia activada i astròcits reactius [revisat a (Selkoe, 2001)].

- 5.1.2.- Els cabdells neurofibril·lars

Moltes de les neurones afectades per la malaltia d'Alzheimer contenen grans feixos de fibres que ocupen gran part del citoplasma perinuclear. Mitjançant microscòpia electrònica s'ha vist que la majoria d'aquestes fibres contenen parells de filaments d'uns 10 nm que formen espirals (PHF, *paired helical filaments*). Els cabdells neurofibril·lars estan formats per la proteïna tau, una proteïna que es troba associada als microtúbuls i

que normalment s'expressa en els axons, però que en la malaltia d'Alzheimer està altament fosforilada i s'agrega de forma anormal al cos cel·lular de les neurones donant lloc a filaments. Existeix una gran varietat de cinases, com per exemple GSK-3, capaces de fosforilar tau a diferents llocs, però no està clar si és una o més cinases les principals responsables d'iniciar la hiperfosforilació de tau que provoca la seva dissociació dels microtúbuls i la seva agregació en els filaments insolubles [revisat a (Selkoe, 2001)].

5.2.- A β vs Tau

S'han suggerit diferents hipòtesis per tal d'intentar explicar la patogènesi molecular de la malaltia d'Alzheimer, les dues més recolzades han estat la hipòtesi amiloidea i la hipòtesi tau.

- 5.2.1.- Hipòtesi Tau

El gran recolzament cap a la hipòtesi amiloidea ha fet que les altres lesions neuropatològiques, com la formació dels cabdells neurofibril·lars, hagin estat considerades un epifenòmen. Tot i així, diferents grups d'investigació recolzen la hipòtesi tau i proposen que els cabdells neurofibril·lars són centrals en la patogènesi de la malaltia d'Alzheimer [revisat a (Mudher and Lovestone, 2002)]. Hi ha estudis que indiquen que les alteracions cognitives estan directament associades amb la hiperfosforilació de tau (Avila and Hernandez, 2007).

Aquesta hipòtesi explica que en la malaltia d'Alzheimer es troba alterada la unió de tau als microtúbuls per un increment en la fosforilació de tau. Aquesta alteració resulta en un augment de tau lliure, que sota les condicions apropiades, s'autoagrega per donar lloc a les espirals de tau. La pèrdua de la unió de tau als microtúbuls resulta en una pèrdua de la funció dels microtúbuls (Gray et al., 1987).

La hipòtesi de tau fins fa poc ha estat considerada incompatible amb la hipòtesi amiloidea. Però estudis recents suggereixen que la sobreproducció de β -amiloid activa diverses cinases, entre elles GSK3, que poden causar hiperfosforilació de tau. Aquests estudis vinculen les dues hipòtesis que en un principi es varen considerar alternatives, en una mateixa cascada d'alteracions bioquímiques causades per una alteració en la

producció de β -amiloid (Blurton-Jones and LaFerla, 2006);(Muyllaert et al., 2008) (Figura 11).

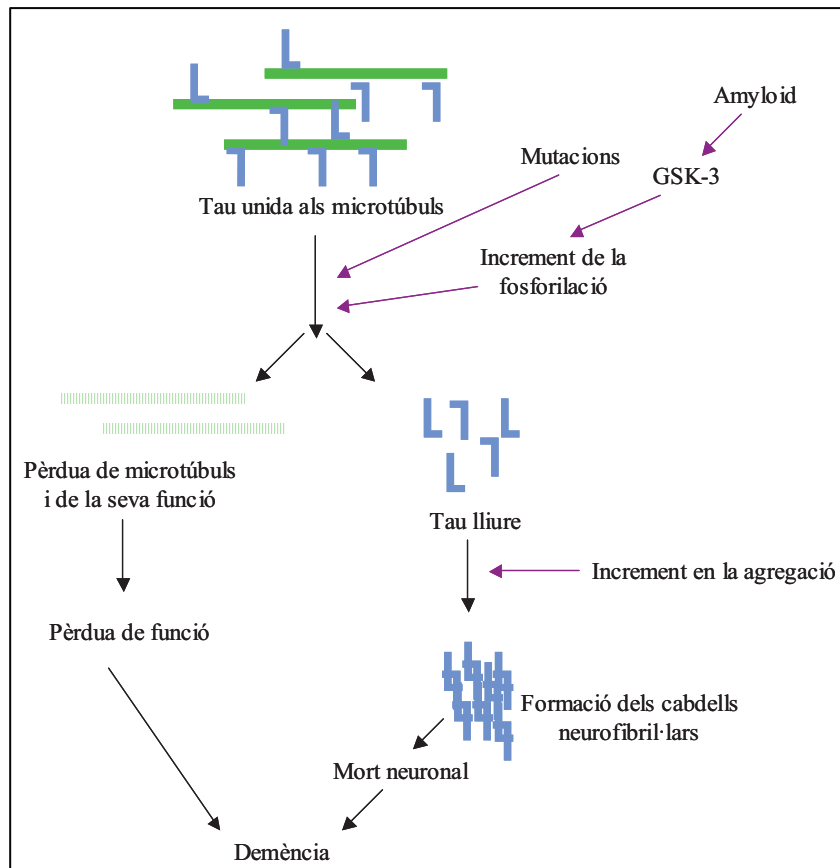


Figura 11. Hipòtesi Tau

- 5.2.2.- Hipòtesi Amiloidea

La hipòtesi amiloidea va ser formulada fa uns 15 anys i postula que l'acumulació de β -amiloid en el cervell és el factor principal que condueix a la malaltia d'Alzheimer i que la resta de processos que es donen en la malaltia, incloent la formació dels cabdells neurofibril·lars, són deguts a l'acumulació de β -amiloid [revisat a (Mudher and Lovestone, 2002) i (LaFerla et al., 2007)] (Figura 12).

Hi ha quatre observacions que recolzen la hipòtesi amiloidea [revisat a (Hardy and Selkoe, 2002)]. La primera és el fet de que mutacions en el gen que codifica per la proteïna tau donen lloc a una demència frontotemporal amb parquinsonisme (Hutton et al., 1998) on s'observen grans deposicions de tau en forma de cabdells neurofibril·lars,

però no es detecta cap acumulació d'A β . Aquest fet indica que fins i tot les conseqüències més severes de l'acumulació de tau no donen lloc a la formació de plaques d'amiloid.

En segon lloc, els ratolins transgènics que sobreexpressen tant l'APP humana mutant com la tau humana mutada mostren una elevada formació de cabdells positius per tau en comparació amb els ratolins que només sobreexpressen tau (Lewis et al., 2001), fet que suggereix que en la cascada patològica de la malaltia d'Alzheimer l'alteració del processat d'APP té lloc abans de que es donin les alteracions en tau.

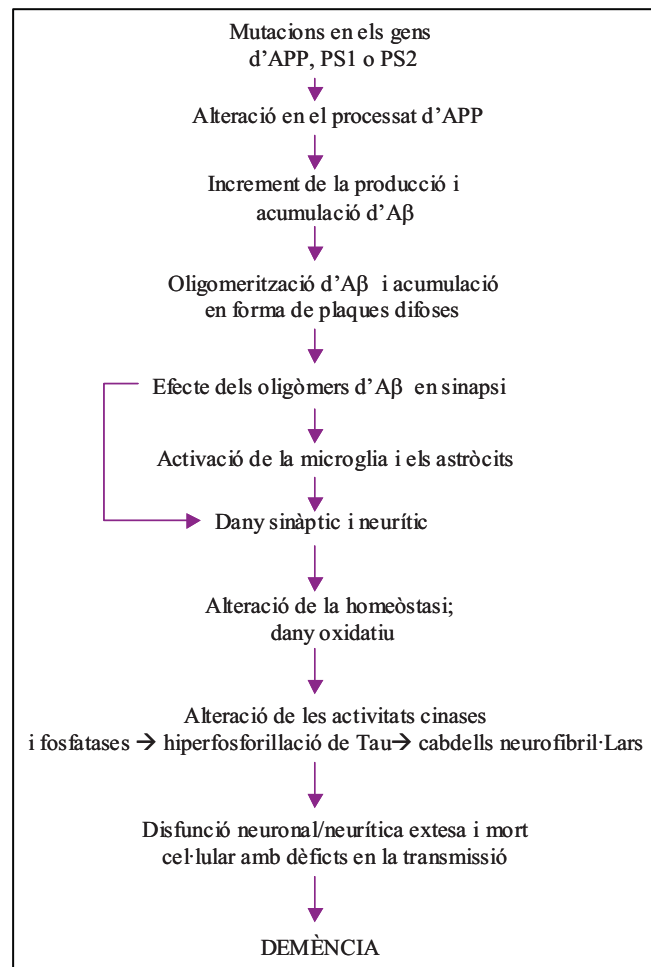


Figura 12. Hipòtesi Amiloidea.

En tercer lloc, el creuament de ratolins transgènics APP amb ratolins deficientes en apolipoproteïna E (apoE) redueix significativament l'acumulació d'A β (Bales et al., 1997), fet que proporciona evidència de que el paper patològic de la variabilitat en el locus del gen *apoE* sembla afectar al metabolisme d'A β . I en quart lloc, cada cop més

evidències indiquen que la variabilitat genètica en el catabolisme i eliminació d'A β contribueixen a incrementar el risc en la malaltia d'Alzheimer d'aparició tardana [(Myers et al., 2000);(Ertekin-Taner et al., 2000);(Bertram et al., 2000);(Olson et al., 2001)] (Figura 12).

5.3.- Factors genètics que predisposen a la AD

Des de fa uns anys se sap que els efectes clínics típics de la malaltia d'Alzheimer es poden trobar al llarg de diferents generacions dins una mateixa família i poden ser heretats específicament de manera autosòmica dominant [revisat a (Selkoe, 2001)]. En els últims anys l'estimació de l'existència de formes heretades de la malaltia d'Alzheimer ha variat del 5-10% fins al 50% o més. Alguns investigadors creuen que, amb el temps, es veurà que la majoria dels casos de malalts d'Alzheimer presenten uns determinats factors genètics que predisposarien a la malaltia, però que el fet de tenir-los no indicaria de manera invariable l'aparició de la malaltia. Tot i que encara no està clar fins a quin punt la malaltia d'Alzheimer està determinada per factors genètics, s'ha vist que el fenotip dels casos d'Alzheimer 'familiar' és indistingible en comparació al fenotip dels casos que aparentment són 'no-familiars' (o 'esporàdics'). La única cosa que els diferencia és el fet de que els casos autosòmics dominants coneguts són d'aparició molt avançada [revisat a (Selkoe, 2001)].

Totes les evidències de mutacions genètiques que afavoreixen l'aparició de la malaltia d'Alzheimer van a favor de que l'A β i el procés d'acumulació d'amiloid són els factors iniciadors de la patogènesi.

- 5.3.1.- Processament de l'APP i mutacions

L'A β és un fragment de 38-43 residus procedent de la proteòlisi de l'APP i és generat en condicions normals al llarg de la vida en totes les cèl·lules de mamífer [(Haass et al., 1992);(Shoji et al., 1992)], però en determinats individus la sobreproducció dels pèptids A β sembla suficient per donar lloc a la malaltia d'Alzheimer [revisat a (Walsh and Selkoe, 2007)].

L'APP és una glicoproteïna de membrana de tipus I molt ubiqüa i amb una vida mitjana curta. Aquesta proteïna en el seu procés de maduració pateix moltes modificacions post-

traduccional com glicosilacions, fosforilacions i diferents tipus de processat proteolític [revisat a (Mudher and Lovestone, 2002);(Selkoe, 2004);(Selkoe, 2001)].

L'APP pot ser processat per l' α -secretasa donant lloc a l'sAPP α , ectodomini soluble d'APP, que s'allibera a l'espai extracel·lular i al fragment C-terminal de 38 residus, anomenat C38, que resta unit a la membrana. Hom ha suggerit que aquest fragment sAPP α podria tenir un paper neuroprotector (Mudher and Lovestone, 2002). El fragment C38 pot ser proteolitzat per la γ -secretasa i d'aquesta manera es forma un petit fragment hidrofòbic anomenat p3.

L'APP també pot ser processat per la β -secretasa, també anomenada BACE (*β -amyloid cleaving enzyme*), i d'aquesta manera es forma l'sAPP β que és alliberat i un fragment C-terminal de 99 residus que és retingut a la membrana i que pot ser a la vegada proteolitzat per la γ -secretasa per tal de donar lloc als pèptids A β que són alliberats. Els pèptids més llargs, que són els A β -42, són els que tenen més tendència a agregar-se i per això es creu que són els més neurotòxics [revisat a (Mudher and Lovestone, 2002);(Selkoe, 2004);(Selkoe, 2001)] (Figura 13).

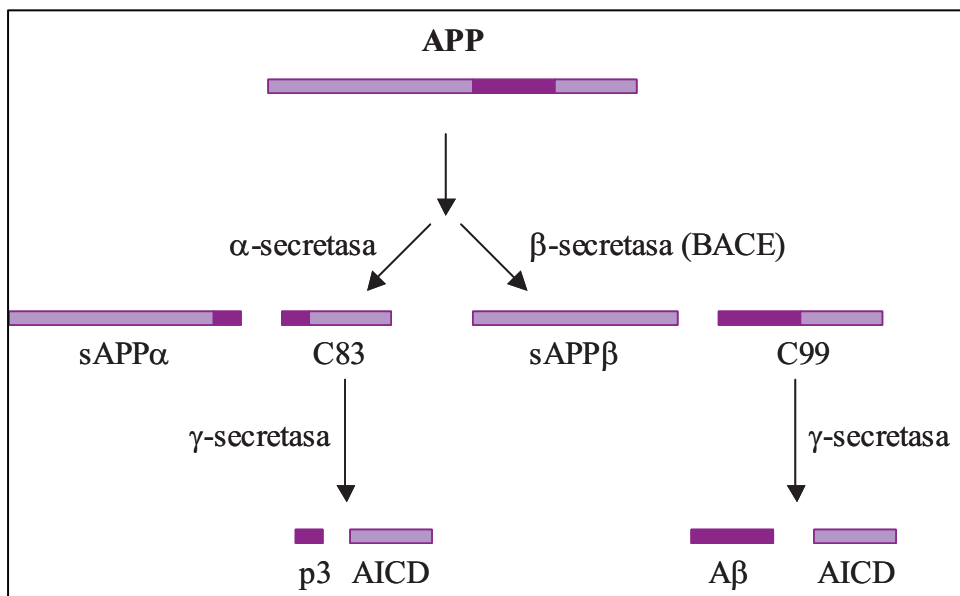


Figura 13. Processat APP.

Tot i que les mutacions en el gen de l'APP van ser la primera causa genètica identificada que dona lloc a la malaltia d'Alzheimer, aquestes mutacions només s'han

observat en unes poques famílies arreu del món [revisat a (Selkoe, 2001)]. Diferents estudis mostren que les mutacions d'APP estan estratègicament localitzades o immediatament abans del lloc de tall de la β -secretasa o poc després dels llocs d'acció de l' α -secretasa i la γ -secretasa. El fet de que no s'hagin trobat més alteracions al llarg de l'APP suggereix que aquestes mutacions donen lloc a la malaltia d'Alzheimer degut a que alteren de diferents maneres el processat proteolític als llocs d'acció de les tres secretases i d'aquesta manera hi ha un increment en la producció i una alteració en les propietats d'agregació de les diferents espècies d'A β [revisat a (Selkoe, 2001) i (Walsh and Selkoe, 2004)].

Existeix una altre cas on alteracions en l'expressió del gen de l'APP poden predisposar a l'aparició de la malaltia d'Alzheimer, com és el cas de la trisomia 21 o Síndrome de Down. El gen de l'APP es troba en el cromosoma 21 (Goldgaber et al., 1987), així en la trisomia 21 hi ha sobreexpressió d'APP estructuralment normal que indueix gairebé de manera invariable a l'aparició prematura de la neuropatologia clàssica de la malaltia d'Alzheimer, tant de les plaques neurítiques com dels cabdells neurofibril·lars [(Tokuda et al., 1997); (Mann, 1988)].

- **5.3.2.- Mutacions en les Presenilines: PS1 i PS2**

La recerca dirigida a trobar nous gens, a part de l'APP, que poguessin induir l'aparició de la malaltia d'Alzheimer en tota la resta de famílies que no s'associaven al cromosoma 21, va donar lloc al descobriment del gen de la *presenilina 1* (*ps1*) en el cromosoma 14 (Sherrington et al., 1995). Es va veure que mutacions de sentit erroni en aquest gen faciliten l'aparició primerenca de la malaltia d'Alzheimer en determinades famílies. Poc temps després, es va descobrir un gen homòleg a la *ps1* en el cromosoma 1 i es va anomenar *presenilina 2* (*ps2*) (Levy-Lahad et al., 1995). Anàlisi posteriors han identificat unes 75 mutacions en el gen de la *ps1* i 3 en el de la *ps2* com les causes moleculars de la malaltia d'Alzheimer d'aparició avançada en diferents famílies de tot el món [revisat a (Hardy, 1997)]. Les mutacions heretades dels gens *ps1* i *ps2* provoquen un increment de la proporció A β 1-42/A β 1-40 i donen lloc als casos de malaltia d'Alzheimer més agressius i d'aparició més avançada [revisat a (Selkoe, 2001)]

i (Walsh and Selkoe, 2004)]. Més tard s'ha vist que les presenilines contenen el lloc actiu de la γ -secretasa que dona lloc a l'A β (Esler et al., 2000).

- **5.3.3.- L'al·lel ϵ 4 de l'Apolipoproteïna E**

Mentre que les mutacions autosòmiques dominants en l'APP i les presenilines són la causa de la malaltia d'Alzheimer de manera poc freqüent, el descobriment de que l'al·lel ϵ 4 de l'apolipoproteïna E (ApoE) predisposa a patir la malaltia d'Alzheimer va proporcionar el factor genètic que fins ara s'ha considerat de major risc (Strittmatter et al., 1993).

L'ApoE és un component dels complexos de lipoproteïnes de baixa (VLDL) i alta (HDL) densitat implicats en el metabolisme i la captació cel·lular del colesterol (Mahley, 1988).

Diferents estudis dirigits a buscar proteïnes del fluid cerebroespinal que s'unissin a pèptids d'A β immobilitzats van permetre la identificació de la proteïna ApoE, el gen de la qual es va localitzar al cromosoma 19, en una regió que prèviament s'havia vist que estava lligada a la malaltia d'Alzheimer en famílies que presentaven l'aparició tardana de la malaltia (Strittmatter et al., 1993). Estudis genètics posteriors han demostrat que l'al·lel ϵ 4 de l'ApoE es troba sobreexpressat en malalts amb Alzheimer i que l'herència d'un o dels 2 al·lells ϵ 4 incrementa la probabilitat de desenvolupar la malaltia d'Alzheimer i també fa que aquesta aparegui abans [(Corder et al., 1993);(Saunders et al., 1993)]. A més, la presència d'aquest al·lel de l'ApoE indueix un increment de la densitat de les plaques i dels dipòsits d'amiloid [revisat a (Selkoe, 2001) i (Walsh and Selkoe, 2004)].

Tot i que la hipòtesi amiloidea ofereix un marc ampli a l'hora d'explicar la patogènesi de la malaltia d'Alzheimer, una de les majors objeccions a aquesta hipòtesi ve donada pel fet de que la quantitat de plaques d'A β presents al cervell no correlaciona bé amb el grau de demència del malalt d'Alzheimer. Fins i tot s'han detectat dipòsits d'A β en persones sense cap simptomatologia de la malaltia d'Alzheimer [revisat a (Hardy and Selkoe, 2002)]. Diferents evidències, però, convergeixen recentment en demostrar que els oligòmers solubles d'A β , i no els monòmers o les fibres insolubles d'amiloid, serien

els responsables de la disfunció sinàptica en el cervell dels malalts d'Alzheimer. A més, la concentració d'aquestes espècies solubles d'A β semblen correlacionar amb el grau de demència dels pacients d'Alzheimer [revisat a (Hardy and Selkoe, 2002) i (Selkoe, 2008)].

5.4.- A β soluble

Un dels primers fets que va fer que es dirigís l'atenció cap als agregats no-fibril·lars d'A β va ser la demostració de que existia una elevada correlació entre els nivells d'A β soluble al còrtex i la pèrdua sinàptica i la severitat del dany cognitiu en cervells de malalts d'Alzheimer (Lue et al., 1999) i (McLean et al., 1999).

Des de que es va conèixer la seqüència d'A β a la dècada dels 80 [(Glenner and Wong, 1984); (Masters et al., 1985); (Selkoe et al., 1986)] diferents grups han utilitzat A β sintètic per tal d'estudiar les seves propietats tòxiques. Uns anys més tard el laboratori de Cotman i Yankner va demostrar que l'A β s'havia d'agregar per tal de ser neurotòxic [(Pike et al., 1991); (Busciglio et al., 1992)], però no va ser fins a uns anys després que es va començar a investigar el paper dels agregats no-fibril·lars d'A β . Els primers estudis que van mostrar que l'A β podia formar altres tipus d'agregats a part de les fibres van ser per part dels laboratoris d'Snyder i de Walsh, els quals van anomenar protofibril·les (PF) als agregats que s'assemblaven a les fibres però que apareixien abans de la detecció de les fibres [revisat a (Walsh and Selkoe, 2007); (Selkoe, 2008)].

Poc temps després de l'aïllament i la identificació de les PFs, el grup de Lambert i col·laboradors va descriure unes petites estructures globulars d'A β 1-42 sintètic que es formen quan s'inhibeix la formació de fibres i les van anomenar ADDLs per *A β -derived diffusible ligands* (Lambert et al., 1998).

Experiments realitzats *in vitro* per aquest laboratori i posteriorment pels grups de Snyder i Shrestha indiquen que els oligòmers sintètics d'A β són potents neurotoxines que disminueixen l'expressió a la superfície dels receptors de glutamat de tipus NMDA (NMDARs), inhibeixen la inducció de la potenciació a llarg termini, LTP (*long term*

potentiation), i alteren la densitat d'espines dendrítiques [(Lambert et al., 1998);(Snyder et al., 2005) i (112);revisat a (Selkoe, 2008)].

A més, s'han detectat oligòmers (dímers, trímers i tetràmers) solubles en el medi condicionat de diferents línees cel·lulars, com les 7PA2, cèl·lules ovàriques d'hamster que expressen APP humà mutat [revisat a (Walsh and Selkoe, 2007)]. El grup de Selkoe i Walsh ha utilitzat el medi condicionat procedent d'aquestes cèl·lules per tal d'investigar l'activitat biològica dels oligòmers d'A β i han vist que la microinjecció de petits volums d'aquest medi al ventricle lateral de la rata indueix una inhibició de la LTP a l'hipocamp (Walsh et al., 2002). Aquests resultats van mostrar per primer cop que els oligòmers d'A β secretats de manera natural alteren la plasticitat sinàptica hipocampal [revisat a (Walsh and Selkoe, 2007)]. Aquest laboratori en estudis posteriors amb seccions organotípiques d'hipocamp de rata també ha demostrat que el nombre d'espines dendrítiques disminueix dramàticament quan les neurones es troben en presència de concentracions sub-nanomolars d'oligòmers d'A β derivats de les 7PA2 i que aquesta pèrdua requereix de l'activitat dels NMDARs (Shankar et al., 2007).

Altres estudis han demostrat que el tractament amb concentracions sub-letals de diferents agregats no-fibril·lars d'A β pot alterar la morfologia de la neurona, pertorbar el transport axonal i reduir els nivells de NMDARs a la superfície cel·lular [(White et al., 1999);(Snyder et al., 2005); (Kelly and Ferreira, 2006); (Zhao et al., 2006)].

Tots aquests resultats indiquen que els oligòmers solubles d'A β podrien ser els responsables de desencadenar la pèrdua sinàptica al cervell i ser els principals causants de la disrupció de la funció cognitiva que té lloc a la malaltia d'Alzheimer [revisat a (Walsh and Selkoe, 2007); (Selkoe, 2008)].

5.5.- Funció d'A β ?

Una de les troballes més importants dels últims anys en el camp de l'Alzheimer va ser per part del grup de Malinow i Sisodia que va proposar una funció per l'A β secretat en condicions normals. Aquest grup va mostrar que l'activitat neuronal modula la formació i secreció dels pèptids d'A β en neurones de seccions d'hipocamp provinents de ratolins que sobreexpressen APP i que a la vegada, A β indueix una depressió de la transmissió

sinàptica excitadora tant en neurones que sobreexpressen APP com en neurones que no ho fan (Kamenetz et al., 2003). També van veure que aquesta depressió de la transmissió sinàptica depèn de l'activitat dels receptors d'NMDA i que pot ser revertida si es bloqueja l'activitat neuronal. Així, proposen que la regulació de la producció d'A β que depèn de l'activitat neuronal participaria en condicions normals en una retroalimentació negativa que mantindria la hiperactivitat neuronal controlada (Kamenetz et al., 2003) (Figura 55A a la Discussió).

5.6.- El programa de mort en la malaltia d'Alzheimer

En cervells de pacients d'Alzheimer hi ha una important pèrdua de sinapsi que es detecta des de les primeres fases de la malaltia [(Davies et al., 1987); revisat a (Selkoe, 2002) i (Selkoe, 2008)]. A aquesta pèrdua de sinapsi i dany neurític li segueix la mort selectiva de poblacions específiques de neurones del còrtex i estructures límbiques (Whitehouse et al., 1982). Estudis recents en models animals de la malaltia d'Alzheimer han mostrat que els oligòmers solubles d'A β interfereixen amb la funció sinàptica abans de que s'indueixi el dany sinàptic i la subsegüent mort neuronal [revisat a (Walsh and Selkoe, 2004) i (Selkoe, 2008)]. No obstant, encara es desconeixen els mecanismes pels quals l'A β produeix el dany sinàptic que dona lloc a la degeneració neurítica i la posterior mort neuronal.

La toxicitat del pèptid A β en cultius primaris de neurones corticals manifesta les característiques morfològiques i bioquímiques de la mort cel·lular programada (Loo et al., 1993). En cervells *postmortem* de malalts d'Alzheimer s'ha detectat la presència de caspases actives i l'acumulació de substrats processats per les caspases, fet que dona suport a la hipòtesi de que mecanismes apoptòtics contribuïrien a la pèrdua neuronal en la malaltia d'Alzheimer (Cotman and Anderson, 1995). A més, estudis recents han demostrat que els oligòmers d'A β exerceixen un efecte sobre les mitocondries en astròcits i neurones, ja que s'ha vist que interaccionen directament amb enzims mitocondrials [(Lustbader et al., 2004); (Takuma et al., 2005)], desestructuren la membrana mitocondrial (Rodrigues et al., 2001) i indueixen un increment de l'estrès oxidatiu (Abramov et al., 2004).

Cada cop més evidències suggereixen que dins dels efectes neurotòxics d'A β s'inclou l'activació de les vies apoptòtiques [(Loo et al., 1993) i (Estus et al., 1997)], però encara no està clar quines vies de senyalització estan implicades en aquest procés. S'ha descrit que la inducció d'apoptosi a través d'A β es caracteritza per una disminució de l'expressió dels membres anti-apoptòtics Bcl-2 i Bcl-x_L [(Wei et al., 2000);(Paradis et al., 1996)] o per un increment de l'expressió dels pro-apoptòtics Bax i Bim [(Paradis et al., 1996) i (Yin et al., 2002)]. A més, en neurones en cultiu s'observa una activació de JNK després del tractament amb A β , i la seva inhibició atenua de manera molt significativa la toxicitat per A β [(Bozyczko-Coyne et al., 2001) i (Morishima et al., 2001)].

Diferents evidències relacionen l'activitat de l'enzim GSK-3 β amb alguns aspectes de la malaltia d'Alzheimer. GSK-3 β és el principal inductor de la hiperfosforilació de tau i, per tant, generador dels cabdells neurofibril·lars [(Pei et al., 1997) i (Takashima et al., 1998)]. També s'ha vist un increment de l'activitat de GSK-3 β en cèl·lules en cultiu tractades amb A β [(Takashima et al., 1993); (Takashima et al., 1998) i (Cedazo-Minguez et al., 2003)].

A més, la mort neuronal induïda per A β en cultius de cèl·lules hipocampals s'impedeix amb el tractament amb inhibidors de la síntesi d'ARN (Takashima et al., 1993), fet que indica que l'A β indueix l'expressió de gens implicats en el programa de mort cel·lular. A la vegada, els patrons d'expressió gènica associats amb aquest programa de mort neuronal s'han comparat amb els observats després de la privació de factor tròfic, com el cas de la reducció d'activitat en les neurones granulars de cerebel madures, els quals donen lloc a mort per apoptosi [(Estus et al., 1997) i (D'mello et al., 1993)]. Degut a aquestes evidències i als resultats obtinguts pel grup de Malinow que mostren que l'A β produeix la depressió de la transmissió sinàptica excitadora, el nostre laboratori ha proposat la hipòtesi de que la neurotoxicitat induïda per A β compartiria mecanismes comuns amb la neurodegeneració apoptòtica induïda per la reducció d'activitat neuronal (Abad et al., 2006).

Antecedents

La malaltia d'Alzheimer està associada a un procés neurodegeneratiu crònic que es caracteritza per un pèrdua primerenca de contactes sinàptics, seguida a continuació per dany a les neurites, reducció del tamany cel·lular i finalment la pèrdua selectiva de neurones en àrees cerebrals específiques.

Ens hem basat en la hipòtesi de que el procés neurodegeneratiu que succeeix en la malaltia d'Alzheimer es causat per mecanismes comuns al programa intrínsec de mort apoptòtica que s'activa quan disminueix l'activitat neuronal.

Per estudis previs del nostre laboratori sabem que el programa intrínsec de mort induït per reducció d'activitat depèn de la sobreexpressió d'NP1, una glicoproteïna que només s'expressa en sistema nerviós.

Hipòtesi

La neurodegeneració en la malaltia d'Alzheimer es produeix pels mateixos mecanismes bioquímics del programa de mort que s'activa per reducció de l'activitat neuronal. Ja que la NP1 forma part del programa de mort, la predicció a partir d'aquesta hipòtesi es que la expressió de NP1 contribueix al procés neurodegeneratiu.

Objectius:

- 1.- Caracteritzar els efectes neurotòxics dels oligòmers solubles d'A β en els cultius de neurones corticals
- 2.- Estudiar el paper de la NP1 en la toxicitat induïda per els oligòmers d'A β
- 3.- Identificar una estratègia per tal de bloquejar la neurodegeneració que té lloc en la malaltia d'Alzheimer.

1.- CULTIU DE CÈL·LULES CORTICALS

Els cultius primaris de cèl·lules corticals es van preparar a partir de fetus de 17-18 dies de la soca Sprague-Dawley. El procediment experimental va ser aprovat per el Comitè ètic de la Universitat de Barcelona, en conformitat amb les línies directrius institucionals nacionals (Generalitat de Catalunya, Decret 214/1997, DOG 2450) i internacionals (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, 1996*).

En primer lloc, es van preparar les plaques de poliestiré en les que es van sembrar les cèl·lules. Pels experiments de mort cel·lular es van utilitzar plaques de 6 pous (9.6 cm²/pou, Falcon), pels experiments destinats a extracció de proteïnes es van utilitzar plaques de 24 pous (1.9 cm²/pou, Costar) i pels destinats a realitzar immunofluorescències es van utilitzar porta-objectes de vidre (0.7 cm²/pou, Nunc). Cada placa o porta-objectes es va incubar amb una solució estèril de poli-L-lisina (100µg/ml) durant un mínim de 2 hores a 37°C a l'incubador. Aquesta solució es va retirar just abans de començar el cultiu.

El medi de cultiu utilitzat va ser el Basal Medium Eagle (BME) (Gibco), amb 100µg/ml de gentamicina, 2mM glutamina, 25mM de KCl, 20mM glucosa i un suplement del 10% de sèrum boví fetal (FBS, *foetal bovine serum*) (Gibco) prèviament desactivat a 56°C durant 30 minuts. Posteriorment, es va filtrar a la campana de cultius amb un filtre d'acetat de cel·lulosa de 0.22µm de tamany de porus (Millipore) i es va temperar a 37°C a l'estufa fins el moment de la seva utilització.

Les solucions necessàries pel processat del teixit van ser les següents:

- Solució 1: Tampó KREBS (120mM NaCl, 4.8mM KCl, 1.3mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 14mM glucosa), 3mg/ml d'albumina de sèrum boví (BSA) i 2.5mM MgSO₄ a un pH final de 7.4
- Solució 2: Solució 1 amb 0.16mg/ml de tripsina (Sigma)
- Solució 3: Solució 1 amb 80µg/ml de ADNasaI (Sigma), 0.52mg/ml d'inhibidor de tripsina (Sigma) i 3.2mM MgSO₄.

- Solució 4: Solució 1 amb 25.6µg/ml de ADNasaI (Sigma), 0.41mg/ml d'inhibidor de tripsina (Sigma) i 1mM MgSO₄.
- Solució 5: Solució 1 amb 0.13mM CaCl₂ i 2.5 mM MgSO₄.

A continuació es va procedir a la obtenció del teixit. Amb una guillotina es va decapitar a la rata gestant de 18 dies i es van extreure els fetus. La resta de passos es va realitzar en condicions estèrils a la campana de cultius.

Per obtenir el còrtex de cada fetus, vàrem immobilitzar el cap i amb unes tisores petites vàrem obrir el crani des del *foramen magnum* avançant lateralment fins als globus oculars. Un cop fet això, vàrem aixecar la part superior del crani per tal de poder extreure el cervell en la seva totalitat. Un cop vam tenir tots els cervells en solució 1, vàrem aïllar els còrtexs amb l'ajut de bisturís, i els vam posar en una altra placa de petri amb solució 1 després d'eliminar les meninges.

El teixit trossejat es va transferir a un tub de centrifugació amb 25 ml de la mateixa solució i es va centrifugar a 200xg durant 1 minut. El precipitat de cèl·lules es va ressuspendre en 25ml de solució 2 i es va incubar a 37° durant 10 minuts en constant agitació. Un cop passat aquest temps, es van afegir 25ml de solució 4 i es va barrejar suaument per inversió per disminuir la viscositat produïda per el ADN alliberat per les cèl·lules mortes durant el procés de tripsinització. Es va centrifugar a 200xg durant 1 minut. Es va decantar el sobrenadant i es va procedir a la disgregació mecànica en 2ml de solució 3, utilitzant una pipeta de 5ml amb una punta de micropipeta a l'extrem, fins que vàrem obtenir una suspensió cel·lular homogènia. Es van afegir 3,5ml de solució 5 i es va centrifugar a 200xg durant 5 minuts. El precipitat de cèl·lules es va ressuspendre en 5ml de medi de cultiu amb sèrum i es va calcular la concentració de cèl·lules per comptatge en una cambra de Neubauer. Per tots els experiments realitzats, les cèl·lules es van plaquejar a una concentració de 2×10^5 cèl·lules/cm², excepte pels experiments destinats a immunofluorescències, que es van plaquejar a baixa densitat, 5×10^4 cèl·lules/cm².

Un cop plaquejades les cèl·lules a la concentració desitjada es van mantenir a 37° en un ambient del 95% d'aire amb un 5% de CO₂. 24h després del cultiu vàrem realitzar un canvi total de medi a DMEM (Gibco) suplementat amb B27 (Invitrogen) i amb 100µg/ml de gentamicina. Vam canviar un terç del medi cada 3-4 dies. Els experiments es van realitzar als 4-7 dies *in vitro* (DIV).

2.- TRACTAMENT DELS CULTIUS CORTICALS AMB EL PÈPTID β -AMILOID

2.1.-Preparació dels pèptids d'A β

Els pèptids A β 25-35, el control inactiu A β 35-25 i l'A β 1-42 es van obtenir de Bachem. A partir dels pèptids liofilitzats, es van preparar solucions estoc 1mM de l'A β 25-35 i A β 35-25 en aigua estèril i es van guardar a -20°C . El mateix dia de l'experiment es va preparar una solució de treball de 0.5mM en PBS 1X (136mM NaCl, 2.68mM KCl, 10.14mM $2\text{H}_2\text{O} \times \text{Na}_2\text{HPO}_4$, 1.76mM KH_2PO_4 , pH 7.4) i es va diluir directament en el medi de cultiu a la concentració desitjada.

Els oligòmers d'A β 1-42, també anomenats *amyloid-derived diffusible ligands* (ADDLs), es van preparar seguint el procediment descrit prèviament per diferents grups [(Lambert et al., 1998), (Dahlgren et al., 2002) i (Klein, 2002)] i que consisteix en 2 etapes:

- 1) Monomerització per Hexafluoroisopropanol (HFIP) (Sigma) i emmagatzematge del pèptid:

L'A β liofilitzat es va descongelar en gel durant 10 minuts i després es va afegir HFIP a 4°C fins a una concentració d'A β 1mM. La solució es va barrejar bé i es va incubar a temperatura ambient durant 1-3h fins que la solució es va tornar transparent. Un cop ben dissolt l'A β , la solució es va incubar 10 minuts en gel, es van fer alíquotes de 60 μl en tubs de microcentrífuga i es va deixar evaporar a la vitrina d'extracció de gasos durant tota la nit a temperatura ambient, fins que l'A β precipita en una fina pel·lícula semitransparent. Al dia següent vàrem acabar d'assecar l'A β precipitat en una centrífuga de buit durant 10 minuts i es van guardar a -80°C . Aquest A β precipitat és estable durant uns mesos.

- 2) Preparació dels ADDLs:

El tub de microcentrífuga amb la pel·lícula d'A β precipitat es va treure de -80°C i es va posar en gel. Es va fer un estoc 5mM en 100% Dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma) ressuspenent l'A β precipitat amb 12 μl de DMSO anhidre (Sigma). Aquest estoc d'A β en DMSO ha de ser transparent. L'estoc 5mM es va diluir a una concentració de 100 μM afegint 600 μl de medi F12 fred sense vermell de

fenol (PromoCell) i es va incubar durant 24h a 4°C, temps necessari per tal de que es formin els oligòmers.

2.2.- Tractament dels cultius primaris de cèl·lules corticals amb A β

Els experiments de mort neuronal i d'extracció de proteïnes es van realitzar un cop les cèl·lules ja eren madures en aquestes condicions de cultiu, que és a partir de 4DIV. Degut a que les cèl·lules corticals en aquest període de maduració, "condicionen" el medi en el que es troben, i són molt sensibles a un canvi total de medi, els experiments es varen realitzar en el mateix medi "condicionat". Així, vàrem posar el volum d'A β corresponent en diferents tubs de microcentrífuga, tants com pous havíem de tractar, vàrem afegir el medi necessari provinent de cada pou, a cada tub i després de barrejar bé per pipeteig, vàrem posar el medi de tractament al seu pou corresponent.

3.- MESURA DE LA VIABILITAT CEL·LULAR I L'APOPTOSI EN ELS CULTIUS CORTICALS

La viabilitat cel·lular es va mesurar seguint dos mètodes diferents. En uns experiments vàrem utilitzar la tinció per iodur de propidi (IP). El dany a la membrana citoplasmàtica permet l'entrada del IP, que interacciona amb l'ADN nuclear i emet fluorescència vermella, d'aquesta manera les cèl·lules viables no presenten marcatge.

En els experiments de curs temporal, la fluorescència per IP es va mesurar en plaques de 24 pous utilitzant un *Cytofluor 2350 scanner* (Millipore), amb un filtre d'excitació de 530nm i un d'emissió de 645nm. El percentatge de les cèl·lules no viables es va mesurar utilitzant una modificació del mètode descrit per Rudolph et al. (Rudolph et al., 1997).

Després de realitzar el tractament es va afegir IP a una concentració de 30 μ M al medi. La primera lectura es va fer una hora després d'iniciar el tractament (F_1). Aquest valor va ser utilitzat com a índex del nivell de mort cel·lular no relacionada amb el tractament. A partir d'aquest moment es van fer lectures a les 18, 24 i 48h de tractament.

Per a obtenir la màxima mort cel·lular dels cultius (F_{max}), es van tractar les cèl·lules amb una concentració de 500 μ M de digitonina, es van incubar durant 10 minuts a 37°C i

es va realitzar la última lectura. El percentatge de mort corresponent a cada temps estudiat es va calcular amb la fórmula següent:

$$\% \text{ mort cel·lular} = [(F_n - F_1) / (F_{max} - F_1)] \times 100$$

F_1 : fluorescència inicial (mort cel·lular no produïda pel tractament)

F_n : fluorescència de cada temps estudiat

F_{max} : fluorescència màxima (100% de cèl·lules mortes)

En altres experiments, el percentatge de cèl·lules no viables es va mesurar per comptatge del nombre de cèl·lules tenyides amb IP i del nombre total de cèl·lules utilitzant de manera simultània imatges de fluorescència i de contrast de fases obtingudes amb un microscopi invertit Olympus IX70 de fluorescència. Per realitzar aquests experiments, les cèl·lules es van plaquejar en plaques de 6 pous, es van incubar amb IP 5 μ M durant 30 minuts, es van fixar amb 4% paraformaldehid (PFA) + 2% sucrosa en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient, i es van rentar amb PBS abans d'afegir una capa protectora de glicerol.

Per l'estudi morfològic de l'apoptosi, les neurones corticals es van plaquejar en plaques de 6 pous, i els nuclis es van tenyir amb Hoechst 33258 (Sigma). Després d'aspirar el medi les neurones es van rentar dos cops amb PBS fred, es van fixar amb 4% PFA + 2% sucrosa en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient i després es van incubar amb metanol fred durant 2 minuts per permeabilitzar les cèl·lules. A continuació, les neurones es van incubar amb Hoechst 33258 a una concentració de 175ng/ml en PBS durant 10 minuts a temperatura ambient i per acabar es van cobrir amb una capa de glicerol. Els nuclis van ser visualitzats utilitzant un microscopi invertit de fluorescència Olympus IX70 amb l'objectiu de 30 augments. En cada experiment, les adquisicions de les imatges les va fer un observador neutral a partir de 3 camps per pou escollits a l'atzar, i com a mínim, es van examinar 3 pous per cada tractament. Les gràfiques corresponents a comptatges cel·lulars representen la mitja \pm error estàndard (ES) de tres experiments independents.

4.- ESTUDI DEL CREIXEMENT NEURÍTCIC EN ELS CULTIUS CORTICALS **TRACTATS AMB A β**

Les neurones corticals es van plaquejar a 5×10^4 cèl·lules/cm² en plaques de 6 pous amb poli-D-lisina/laminina (Becton Dickinson). Vàrem obtenir imatges de contrast de fases a partir de les neurones corticals no fixades amb un microscopi invertit de fluorescència Olympus IX70 amb l'objectiu de 30 augments utilitzant el programa d'anàlisi d'imatges Analysis (Soft Imaging System). La llargària de les neurites es va determinar utilitzant un procediment estereològic (Ronn et al., 2000). La longitud neurítica total per cèl·lula es va calcular a partir del comptatge del nombre d'interseccions que feien les neurites amb les 10 línees d'una plantilla. El comptatge el vàrem realitzar superposant la imatge de contrast de fases de les neurones amb la plantilla (Figura 14).

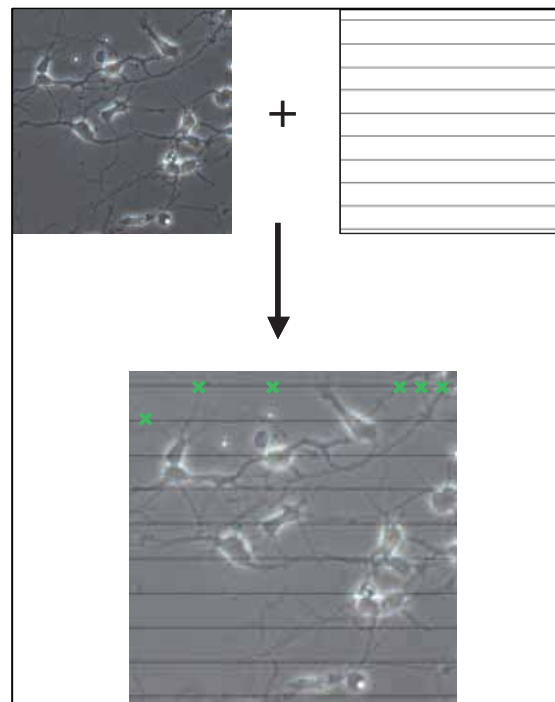


Figura 14. Comptatge de neurites pel mètode estereològic.

La longitud neurítica absoluta (L) per cèl·lula es va estimar a partir del nombre d'interseccions (I) per cèl·lula aplicant l'equació següent que descriu la relació entre el

nombre d'interseccions neurítiques i la distància vertical, en les 10 línies de la plantilla (Ronn et al., 2000):

$$L = (\pi d/2) I$$

On d és la distància vertical entre dues línies de la plantilla (en el nostre cas la distància entre les línies és 20µm ja que és el diàmetre mig del soma de les corticals) i I és el nombre d'interseccions entre les línies i les neurites.

5.- IMMUNOFLUORESCÈNCIA DELS CULTIUS DE CORTICALS

Les neurones es van plaquejar en porta-objectes amb pous (Lab-Tek Chamber Slides, NalgeNunc) amb poli-L-lisina (100µg/ml), a la densitat de 5×10^4 cèl·lules/cm² pels estudis de longitud neurítica i a la densitat de 2×10^5 cèl·lules/cm² per la immunofluorescència contra caspasa 3 activada. Les neurones es van fixar durant 15 minuts amb 4% PFA +2% sucrosa en PBS, a continuació es van permeabilitzar amb 0.2% Tritó X-100 en PBS durant 5 minuts a temperatura ambient i es van rentar amb PBS. Els porta-objectes es van bloquejar durant 1 hora amb la solució de bloqueig que consistia en 10% de sèrum normal de cabra (NGS) i 1% de BSA en PBS. Després es van incubar amb els anticossos primaris diluïts en una solució 1% BSA en PBS durant tota la nit a 4°C. Els anticossos primaris utilitzats van ser l'anticòs de ratolí contra tubulina α -tirosinada (Sigma) a la dilució 1:800, l'anticòs de conill contra Caspasa 3 humana activada (Cell Signalling) a la dilució 1:100, l'anticòs de ratolí contra MAP2 (2a+2b) (Sigma), específic pel marcatge de dendrites, a la dilució 1:250 i l'anticòs de conill contra la sinapsina (Sigma), proteïna associada a les vesícules pre-sinàptiques, a una dilució 1:500. El dia següent es van deixar amb l'anticòs secundari corresponent conjugat amb el fluorocrom Alexa Fluor®568 durant 1 hora a temperatura ambient. Els anticossos secundaris utilitzats van ser el fragment F(ab')₂ de l'anticòs de cabra contra immunoglobulines G de ratolí conjugat amb Alexa Fluor®568 o Alexa Fluor®488 (Invitrogen) i el fragment F(ab')₂ de l'anticòs de cabra contra immunoglobulines G de conill conjugat amb Alexa Fluor®568 o Alexa Fluor®488 (Invitrogen), els quatre utilitzats a una dilució 1:1000. Abans de fer les incubacions amb la solució amb l'anticòs primari o secundari es va centrifugar durant 2 minuts a 13600 xg a 4°C per eliminar els precipitats de l'anticòs que podrien afectar a la posterior detecció. Després

d'incubar amb l'anticòs secundari es van fer dos rentats amb PBS 1X i es van muntar els porta-objectes amb el medi de muntatge Prolong Antifade (Molecular Probes).

6.- VECTORS LENTIVIRALS

Els vectors lentivirals permeten la transducció eficient, integració i expressió estable de transgens tant en cèl·lules en divisió com en cèl·lules arrestades en G₀.

Per tal de poder expressar transgens en els cultius primaris de cèl·lules corticals, vàrem utilitzar els vectors lentivirals d'expressió bicistrònica, pWPI i pLVTHM i els dos plàsmids d'empaquetament de segona generació (de la càpside, psPAX2, i de l'envolta, pMD2G) cedits per el Dr. Didier Trono (Lausane, Suïssa) [(Wiznerowicz and Trono, 2003), (Wiznerowicz and Trono, 2005) i (Zufferey et al., 1998)] (Figura 15).

El vector lentiviral pWPI porta el promotor del Factor d'Elongació 1 alfa (EF1 α) i una regió central de polipurines de 5' a 3' (cPPT) que millora l'eficiència de la transducció dels gens. A més, també porta un cassat d'expressió, la seqüència de lloc intern d'entrada al ribosoma del virus de la encefalomiocarditis, IRES (*encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site*) que permet la iniciació de la síntesi proteica en mig de la traducció del marc obert de lectura d'un ARN missatger i la proteïna verda fluorescent (GFP) codificada després de l'IRES. Per millorar l'expressió gènica el plàsmid també porta l'element regulador post-transcripcional del virus de l'hepatitis del marmota (Figura 15).

El vector pLVTHM a més, porta el promotor de la H1 ARN polimerasa III que permet l'expressió d'un shARN (*short hairpin* ARN) per ARN interferència (Wiznerowicz and Trono, 2003)(Figura 15).

La seqüència codificant de la NP1 es va clonar a partir de cADN de cervell de rata (Quick Clone cADN; Invitrogen) per PCR. El vector pWPI-NP1-GFP es va obtenir per inserció del cADN de la NP1, que contenia la seqüència consens Kozak ACC abans del codó d'iniciació, per lligació *blunt-end* utilitzant els llocs de restricció PmeI del vector pWPI.

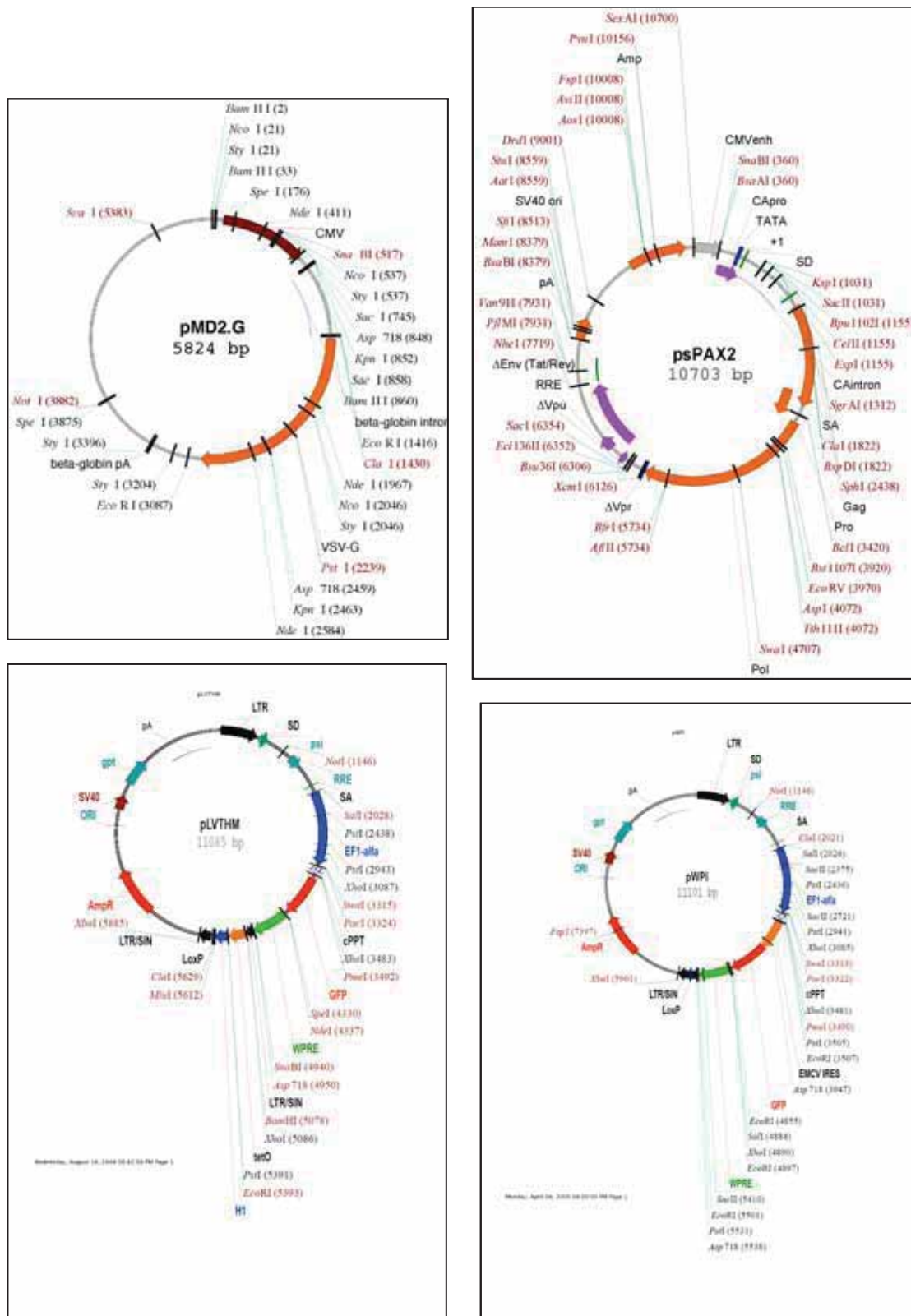


Figura 15. Vectors lentivirals: *pMD2G*, *psPAX2*, *pLVTHM* i *pWPI*.

6.1.- Obtenció del vector pWPI-NP1

- 6.1.1.- Digestió del vector pWPI

D'una banda vàrem digerir el pWPI amb l'enzim de restricció PmeI (Fermentas) que dóna lloc a un plàsmid amb extrems roms. En un tub de PCR vàrem afegir en l'ordre següent: 2µg de plàsmid, 2µl de tampó B 10X, necessari per l'activació de l'enzim, 16µl d'aigua i 5 unitats de PmeI. La reacció es va incubar durant 1 hora a 37°C. Un cop digerit, el vam defosforilar seguint el protocol de Fermentas, afegint a la reacció anterior 1µl de *shrimp alkaline phosphatase* (SAP, Fermentas) (1 unitat) per tal d'evitar l'autolligació del plàsmid, i ho vam incubar durant 30 minuts a 37°C. A continuació, per tal de parar la reacció, vàrem escalfar la reacció a 65°C durant 15 minuts. Amb aquest procediment vam aconseguir aproximadament 100ng/µl de vector defosforilat que podem utilitzar directament per fer la lligació.

- 6.1.2.- Insert d'NP1 amb extrems roms

Per tal de poder lligar l'insert d'NP1 amb el vector pWPI, vam haver d'omplir les terminacions de l'insert amb la T4 ADN polimerasa per tal de que tingués extrems roms. Per tal de fer extrems roms vam seguir el protocol de Fermentas de la T4 ADN polimerasa. Vam afegir 1µg d'insert d'NP1 en un tub de PCR, 1µl d'una barreja de dNTP (deoxinucleòtids trifosfat) 2mM, 4µl de tampó de reacció 5X, 11.5µl d'aigua i per últim 0.5µl de T4 polimerasa (2.5 unitats).

Vam incubar la reacció a 11°C durant 20 minuts i vam desactivar-la escalfant-la a 70°C durant 10 minuts. Així vam obtenir uns 37ng/µl aproximadament, que vam utilitzar directament per fer la lligació.

- 6.1.3.- Lligació i transformació en DH5α

Un cop vam tenir el plàsmid digerit i defosforilat i l'insert d'NP1 amb extrems roms, vam fer la lligació amb el kit Rapid Ligation (Fermentas).

Per fer la lligació vam utilitzar una relació molar insert:vector de 4:1, amb 4µl de tampó de lligació 5X, 11µl d'aigua i 1µl de T4 ADN ligasa (5 unitats). Després d'incubar durant 10-15 minuts a 22°C es va fer servir 4µl de la reacció per transformar en DH5α.

Vàrem fer la transformació en cèl·lules DH5α competents. En primer lloc vam descongelar una alíquota de 200µl de DH5α en gel i vam afegir els 4µl de reacció de lligació, es va barrejar suaument i es va incubar el tub durant 45 minuts en gel. A continuació es va fer un xoc tèrmic de 5 minuts a 37°C en un bany sense agitació. Passat aquest temps, es van sembrar les cèl·lules transformades en plaques d'agar amb 60µg/ml d'ampicil·lina i es van incubar a 37°C fins el dia següent.

- 6.1.4.-Cultiu líquid, Miniprep i comprovació de colònies de la lligació per digestió amb l'enzim de restricció NotI

Per tal de seleccionar els plàsmids amb insert es va fer el cultiu líquid de diverses colònies de la placa del punt anterior. Es van picar colònies de la placa d'agar i es van cultivar en 5 ml de medi LB (Luria-Bertrani medium, que per 1 litre porta: 10g de triptona, 5g d'extracte de llevat, 10g de NaCl, pH 7) amb ampicil·lina 60µg/ml durant tota la nit a 37°C i 250rpm.

La purificació del plàsmid es va fer amb el kit WIZARD® PLUS de Minipreps de Promega.

En primer lloc vàrem precipitar les bacteries dels cultius líquids centrifugant els 5ml a 1400g durant 10 minuts a 4°C. Després de decantar els sobrenadants es van ressuspendre els precipitats amb 400µl de tampó de ressuspenió i es van transferir a un nou tub de microcentrífuga. A continuació es van afegir 400µl de tampó de lisi. Immediatament després es van posar 400µl de neutralització i es van tornar a invertir suaument 4 vegades. Després es van centrifugar els tubs a 10.000g durant 5 minuts a temperatura ambient. Durant aquests 5 minuts es van preparar les columnes amb 1ml de resina cadascuna. Es van transferir els sobrenadants sobre la resina de les columnes i es va aplicar el buit per fer passar la mostra per la resina i permetre la unió de l'ADN a la columna. Un cop tota la mostra havia passat es van rentar les columnes amb 2ml de tampó de rentat i es va tornar a aplicar el buit. Després d'això, es va transferir cada

columna a un tub de microcentrífuga i es van centrifugar a 10.000g durant 10 minuts per treure el tampó de rentat residual. Es van transferir les columnes a un tub nou, es va afegir aigua estèril per eluir l'ADN a cada columna i després d'esperar 1 minut es van centrifugar a 10.000g durant 10 minuts per recollir l'ADN eluït.

Per comprovar quins dels plàsmids tenien insert i si aquest estava col·locat en el sentit correcte, vam fer una digestió amb l'enzim de restricció NotI ja que el plàsmid pWPI i l'insert NP1 tenen una diana NotI, així:

- 1) Si no hi havia insert esperàvem una banda de 11.000bp, que correspon al tamany del vector pWPI
- 2) Si hi havia insert en posició sentit esperàvem dues bandes, una de 2663bp i l'altra de 9737bp
- 3) Si hi havia insert en posició antisentit esperàvem dues bandes també, però una de 344bp i l'altra de 9000bp.

Es van digerir 2µg de ADN amb 10 unitats de NotI (Pharmacia) en presència de tampó OPA 1X suplementat amb 0.1% Tritó X-100 i 100mM NaCl en un volum final de 20µl. Es va incubar la reacció durant 2 hores a 37°C i vam carregar la reacció directament en un gel d'agarosa de l'1% (Figura 16).

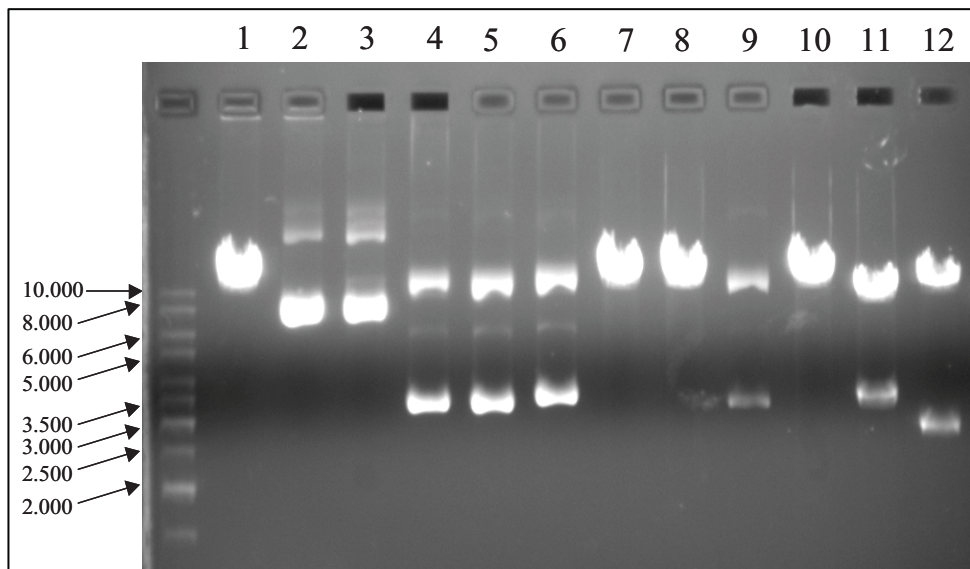


Figura 16. Comprovació de les colònies procedents de la lligació d'NP1 amb pWPI mitjançant la digestió amb NotI. 1) PWPI digerit; 2) pWPI no digerit; 3) Plàsmid de la colònia 1 no digerit; 4-12) Plàsmids de 9 colònies diferents digerits amb NotI, dels

quals el 4,5,6,9 i 11 tenen l'insert en posició antisentit, el 7,8 i 10 no tenen insert i el 12 és l'únic que té l'insert en posició sentit.

6.2.- Obtenció del vector pLVTHM-shARNi

El vector pLVTHM-shARNi-NP1-GFP es va dissenyar per tal d'expressar ARNs d'interferència contra el missatger d'NP1.

La tècnica de l'ARNi és el procés mitjançant el qual ARNs de doble cadena silencien l'expressió de gens específics. Breument, en primer lloc l'enzim DICER reconeix l'shARN i el talla en fragments d'ARN de doble cadena (siRNA, *small interfering RNA*) que a la vegada són reconeguts pel complex proteic RISC. RISC separa les dues cadenes d'ARN i s'uneix preferencialment a la cadena antisentit. El complex format per RISC i la cadena antisentit es dirigeix a la seqüència d'ARNm homòloga i la destrueix, donant lloc, d'aquesta manera al silenciament específic del gen (Figura 17).

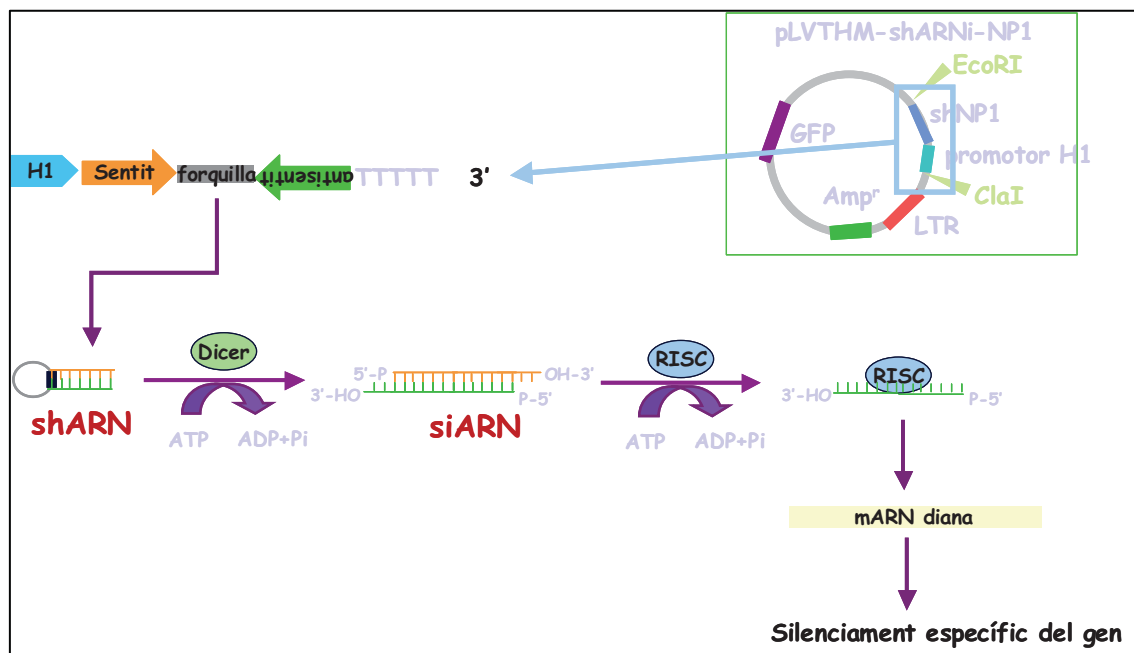


Figura 17. Silenciament gènic mitjançant l'ARN d'interferència.

La seqüència dirigida contra l'ARN missatger d'NP1 que vam utilitzar, la vam seleccionar basant-nos en les normes de susceptibilitat d'ARN d'interferència proposades per el grup de Tuschl (Elbashir et al., 2001) i utilitzant el programa de

predicció d'ARNi del grup de Bioinformàtica del *Whitehead Institute for Biomedical Research*.

- 6.2.1.- Anellament i lligació dels shARNi amb el vector pSuper.retro

Dos oligonucleòtids d'ADN complementaris demanats a Roche, es van anellar per produir un fragment de doble cadena d'ADN codificant una cadena sentit de 19-nucleòtids, un loop de 9-nucleòtids i una cadena de 19-nucleòtids antisentit contra la NP1 o d'una seqüència a l'atzar. La seqüència de l'shARNi de NP1 es: 5'-gatccccGTACAGCCGCCTCAATTCTtcaagagaAGAATTGAGGCGGCTGTACTtttt-3' (sentit) i 5'-agctaaaaGTACAGCCGCCTCAATTCTtctcttgaaAGAATTGAGGCGGC-TGTACggg-3' (antisentit). La seqüència en majúscules és la seqüència diana de NP1 que correspon a les bases 1004-1022 de l'ARNm de NP1 (número d'identificació del GeneBank, U18772).

També es va dissenyar un shARNi amb una seqüència al atzar (Random) per utilitzar com a vector lentiviral control. La seqüència del shARNi-Random es: 5'-gatccccGCAGTGCAATATCGGAAACtcaagagaGTTTCCGATATTGCACTGCtttt-3' (sentit) i 5'-agctaaaaGCAGTGCAATATCGGAAACtctcttgaaGTTTCCGATATTGC-ACTGCggg-3' (antisentit).

Teníem la seqüència de silenciament de la NP1 en el vector pSUPER.retro, entre les dianes HindIII i BglII. Després de confirmar la capacitat de la seqüència per silenciar la NP1 en uns clons de les cèl·lules de neuroblastoma humà, SH-SY5Y, que sobreexpresen NP1 de manera permanent, vam digerir el cassette H1-shARN del vector pSuper.retro i el vam clonar en el vector lentiviral pLVTHM entre els llocs de restricció EcoRI i ClaI.

- 6.2.2.- Digestió EcoRI i ClaI

Vam fer digestió simultània EcoRI-ClaI del pSuper-shRandom, pSuper-shNP1 i del plàsmid pLVTHM. Vam digerir uns 3µg de cada plàsmid en tampó H 1X amb 1µl d'EcoRI (10 unitats) i 1 µl de ClaI (10 unitats).

Vam córrer la digestió en un gel d'agarosa del 2.7% i un cop purificades les bandes seguint el mateix procediment descrit anteriorment, vam fer la lligació dels shARNi amb el vector pLVTHM.

- 6.2.3.- Lligació dels shARNi amb el vector pLVTHM

En aquest cas la lligació va ser més senzilla ja que teniem extrems protuberants. Per fer la lligació vam seguir el mateix procediment que per fer la lligació del pWPI amb la NP1 i vam fer servir 4µl de la reacció de lligació directament per transformar en DH5α.

La transformació i la miniprep les vam fer seguint els passos descrits anteriorment i per assegurar-nos que hi havia insert en les diferents colònies, vam fer la comprovació mitjançant la digestió amb EcoRI i ClaI.

Es van digerir 2µg d'ADN amb 40 unitats de ClaI i EcoRI en presència de tampó H 1X en un volum final de 20µl. Es va incubar la reacció durant 2 hores a 37°C i vam carregar la reacció directament en un gel d'agarosa de l'1%.

6.3.- Producció de virus

Les partícules víriques pseudotipades amb la glicoproteïna G del virus de la estomatitis vesicular es van produir per transfecció transitòria en cèl·lules 293T plaquejades en plaques de 100mm de diàmetre amb DMEM amb 10% de FBS. Les cèl·lules 293T es van plaquejar el dia abans de la transfecció de manera que el dia de la transfecció estiguessin a un 70% de confluència aproximadament. Les 293T es van transfectar seguint el mètode de transfecció per fosfat de calci. En un tub de 15ml es van afegir 20µg del vector lentiviral amb el transgen, 15µg del plàsmid empaquetador o càpside, psPAX2, i 6µg del plàsmid de l'envolta, pMD2G. Després es va afegir aigua i HBS 2X pH 7.05 (273mM NaCl, 10.2mM KCl, 1.4mM Na₂HPO₄, 42mM HEPES i 10mM Glucosa). A continuació es va afegir el CaCl₂ 2.5M gota a gota per tal de produir la precipitació del ADN. La barreja es va incubar uns 20-25 minuts a temperatura ambient

i es va afegir 1ml a la placa de 293T on prèviament havíem canviat els 10ml de medi per 5ml de medi fresc. Unes 8 hores després de fer la transfecció es canviar el medi de transfecció per 10ml de medi fresc. 48 hores després de la transfecció vam recollir el sobrenadant viral i vam fer una ultracentrifugació a 20.000rpm durant 2 hores a 4°C per tal d'obtenir les partícules víriques concentrades. Un cop feta la ultracentrifugació vam descartar el sobrenadant i vam afegir 150µl de TNE (50mM Tris HCl pH 7.5, 130mM NaCl i 1mM EDTA) i això ho vam deixar tota la nit a 4°C a 175rpm per tal de ressuspendre el precipitat de virus. Al dia següent vam fer les alíquotes de les partícules víriques i les vam emmagatzemar a -20°C fins al moment d'utilitzar-les.

6.4.- Titulació dels lentivirus

Vam fer la titulació dels virus obtinguts seguint el protocol recomanat pel laboratori de Didier Trono que va consistir en plaquejar 30.000 cèl·lules 293T per pou de placa de 24 pous en 1 ml de medi. Al dia següent es van comptar les cèl·lules en un pou per tal de tenir el comptatge de cèl·lules per pou en el moment de fer la infecció i en la resta de pous es van transduïr les cèl·lules amb dilucions seriades en un volum final de 250µl. Vam començar les dilucions amb 20µl de virus concentrats i vam fer 10 dilucions seriades a partir de la primera. 24 hores després es va afegir 1ml de medi a cada pou i 2 dies després es van tripsinitzar les cèl·lules i es va analitzar l'expressió de GFP per citometria de flux. La titulació ens dona el nombre o percentatge de cèl·lules transduïdes per un volum determinat de virus.

Data titulació	virus conc.	shRandom	shNP1	Data titulació	virus conc.	Control	NP1
29/03/2006	23/03/2006	5,9E+09	4,3E+09	08/03/2006	03/03/2006	4,6E+07	1,6E+07
08/05/2006	27/04/2006	4,1E+09	3,0E+09	11/05/2006	11/05/2006	2,3E+09	5,1E+08
09/10/2006	05/10/2006	2,6E+09	8,3E+08	01/06/2007	31/05/2007	4,3E+10	9,9E+09
25/06/2007	21/06/2007	1,7E+10	1,9E+10	02/07/2007	28/06/2007	1,3E+10	3,15E+09
22/10/2007	11/10/2007	4,34E+09	2,53E+09	09/07/2007	05/07/2007	2,5E+09	4,8E+08
20/11/2007	15/11/2007	1,14E+09	6,87E+09	22/10/2007	04/10/2007	4,78E+09	5,73E+07
				20/11/2007	15/11/2007	1,97E+09	9,07E+08
mean		5,8E+09	6,1E+09	mean		9,7E+09	2,1E+09

Taula 2. Mitja de les diferents titulacions obtingudes.

Nosaltres vàrem obtenir de mitja entre els empaquetaments dels diferents plàsmids uns valors d'aproximadament 7×10^9 unitats de transducció/ml (TU/ml) (Taula 2).

7.- TRANSDUCCIÓ DE LES CÈL·LULES CORTICALS AMB ELS LENTIVIRUS

Les partícules lentivirals es van afegir als cultius de neurones corticals immediatament després de plaquejar o un cop les cèl·lules ja estaven madures, en un volum de 5-1 μ l d'estoc lentiviral segons el tamany del pou a infectar, que correspon aproximadament a unes 6x10⁶ TU per pou. El percentatge de cèl·lules expressant GFP 48 hores després de la transducció lentiviral va ser del 80-90% (Figura 18).

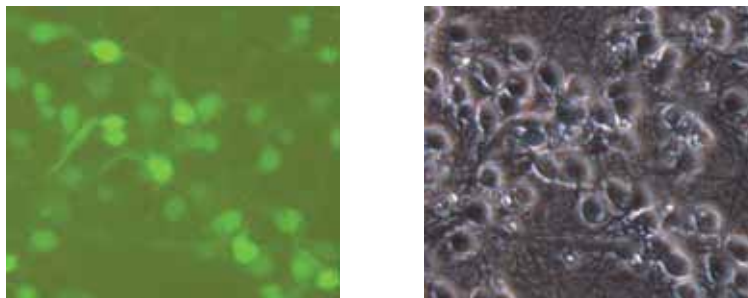


Figura 18. Imatges d'expressió de GFP i contrast de fases de cèl·lules corticals transduïdes.

8.- SÍNTESI D'OLIGODEOXIRIBONUCLEÒTIDS I TRACTAMENT DELS CULTIUS CORTICALS

Els oligodeoxiribonucleòtids (ODNs) fosforitioats antisentit contra l'ARNm de la NP1 i el seu corresponent ODN antisentit es van demanar a Roche Molecular Biochemicals. Els ODNs tenien una llargària de 21 parells de bases i les seqüències utilitzades van ser: 5'-GCGTGCGGCGCGGCCGCCAG per l'ODN antisentit de NP1 (NP1AS) i 5'-CTGGCCGGCCGCGCCGCACGC pel corresponent ODN sentit (NP1S). Els

nucleòtids fosforotioats, per tal d'assegurar l'estabilitat de la seqüència, estan subratllats. La seqüència de l'ODN antisentit de NP1 correspon als nucleòtids 4-24 que es troben immediatament a continuació del primer codó d'iniciació de la seqüència codificant del cADN de la NP1. El silenciament de l'expressió de NP1 en les neurones corticals mitjançant els ODNs es va fer utilitzant LipofectaAMINE 2000 (Invitrogen). Es va preparar el complex NP1S o NP1AS (0.8µg)-LipofectaAMINE, amb una proporció de 1:3, seguint les instruccions d'Invitrogen i es va afegir als cultius de corticals de 4DIV.

El medi de cultiu condicionat per les cèl·lules es va treure i es va guardar. Els cultius es van rentar amb BME per tal de treure els antibiòtics, que podrien interferir en el procediment, i es van afegir 0.4ml de medi de transfecció (BME sense glutamina ni antibiòtics, a 37°C i a pH 7.4) als pous corresponents. A continuació es van afegir 100µl del complex ADN-lipofectaAMINE a cada pou i les cèl·lules es van incubar a 37°C en un incubador de 5% CO₂ durant 4 hores. Un cop passades les 4 hores, el medi de transfecció es va aspirar i es va substituir per el medi condicionat. Els experiments de tractament amb β-amiloid es van realitzar immediatament després.

9.- ASSAIG DE WESTERN BLOT DE LES PROTEÏNES EXTRETES A PARTIR DELS CULTIUS PRIMARIS DE NEURONES CORTICALS

Els estudis sobre els nivells de proteïnes es van realitzar mitjançant la tècnica de *western blot*. L'objectiu central d'aquests estudis va ser l'anàlisi dels canvis d'expressió de la proteïna NP1 induïts per el tractament de les cèl·lules corticals a diferents temps amb Aβ.

9.1.- Extracció de proteïnes

Després de fer els tractaments corresponents en els cultius de neurones corticals i un cop transcorregut el temps necessari per l'estudi de la proteïna d'interès, es va realitzar l'extracció de proteïnes.

El tampó de lisi utilitzat va ser l'SDS 1X amb EDTA:

- 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8

- 2% SDS
- 10% glicerol
- 2.5mM EDTA
- 75mM DTT
- 0.01% bromophenol blue (BPB)

Amb la placa de cultiu de 24 pous sobre gel, es van rentar les cèl·lules amb 750µl de PBS 1X. Després de retirar el PBS, es van afegir 50µl de tampó de lisi a cada pou i es va rascar la superfície amb una punta de micropipeta de 200µl per aixecar les cèl·lules. A continuació es van recollir les cèl·lules en un tub de microcentrífuga, es van bullir durant 5 minuts, es van sonicar durant 10 minuts en un bany d'ultrasons i es van guardar a -80°C fins el moment de carregar-les.

Per separar les proteïnes es van utilitzar gels desnaturalitzants del 10% i del 8% de poliacrilamida. En algun cas vam haver de fer gels del 8% per tal de poder visualitzar millor proteïnes d'elevat pes molecular.

Les mostres es van descongelar en gel. La presència de BPB en el tampó d'extracció impedeix la determinació de la concentració de proteïna present a les mostres, així en totes les electroforesi realitzades es va carregar el mateix volum de mostra, 20µl, que corresponen a uns 14-20µg de proteïna.

Les electroforesi es van realitzar en el sistema Mini Trans-Blot de BioRad.

9.2.- Preparació del gel d'acrilamida

En primer lloc, es va preparar el gel resolutiu i es va col·locar entre els dos vidres prèviament netejats amb etanol absolut. Per permetre la polimerització de la matriu, es va aïllar el gel de tot contacte amb l'aire mitjançant una capa d'aigua situada per sobre d'ell. La composició del gel resolutiu del 10% d'acrilamida va ser:

- 1.2ml d'aigua bidestil·lada
- 3.75ml de Tris-HCl 0.75M pH 8.8; 0.2% SDS
- 2.55ml de solució 30% acrilamida-0.8% bisacrilamida (Sigma)

- 10.5µl de TEMED (Sigma)
- 37.5µl de solució 13% de persulfat d'amoni (PSA)

En els gels del 8% de poliacrilamida es van posar 2.1ml de solució de 30% acrilamida-0.8% bisacrilamida i 1.65ml d'aigua bidestil·lada, sense variar els volums de la resta de components.

Després de deixar polimeritzar durant 30 minuts, es va retirar la capa d'aigua situada sobre el gel i es va preparar el gel empaquetador, que es va col·locar a sobre del gel resolutiu i es van introduir immediatament unes pintes entre els vidres per tal de formar el pous. Als 20 minuts el gel ja estava preparat per carregar.

La composició del gel empaquetador va ser:

- 0.9ml d'aigua bidestil·lada
- 1.125ml de Tris-HCl 0.25M pH 6.8; 0.2% SDS
- 0.27ml de solució 30% acrilamida- 0.8% bisacrilamida (Sigma)
- 5.6µl de TEMED (Sigma)
- 22.5µl de solució 13% PSA

9.3.- Electroforesi de les mostres

A més de les mostres corresponents als experiments, en cada gel es va destinar un carril per carregar un marcador de pes molecular (Fermentas). Les proteïnes que conformen aquest marcador estan unides a un cromòfor blau que fa possible la seva visualització, tant en el gel d'electroforesi com en la membrana després de la transferència, i a més facilita la identificació de les proteïnes estudiades pel seu tamany.

L'electroforesi es va realitzar a 130 volts en tampó TGS 1X (25mM Tris-HCl pH 8.3, 192mM glicina, 0.1% (w/v) SDS), preparat a partir d'un estoc TGS 10X de BioRad. Quan el front de BPB va arribar al final del gel, es va parar l'electroforesi, aproximadament 1 hora i mitja després de començar-la.

9.4.- Transferència a membranes de PVDF (*polyvinylidene difluoride*)

La transferència a membranes de PVDF (Millipore) de les proteïnes separades per electroforesi en els gels de poliacrilamida es va realitzar amb el sistema Mini Trans-Blot de BioRad.

El tampó utilitzat va ser el TG 1X (25mM Tris-HCl pH8.3, 192mM glicina, 20% metanol), preparat a partir d'un estoc TG 10X (BioRad).

Al acabar l'electroforesi, es van submergir els gels durant 10 minuts en tampó de transferència. Durant aquest temps es van activar les membranes incubant-les durant 2 minuts amb metanol i es van rentar durant uns 10 minuts en tampó de transferència.

Es va realitzar el muntatge en un casset de reixetes. Sobre la reixeta negra, que va quedar en contacte amb el càtode, es va col·locar una esponja molla en tampó de transferència i, sobre ella, dos papers whatmann 3MM també humits. A continuació es va col·locar el gel, i sobre d'ell, la membrana de PVDF. Es van eliminar bé les bombolles formades en el procés, passant molt suaument un fragment de pipeta de 2ml sobre la superfície plana de la membrana. Es van col·locar dos papers whatmann més humits sobre la membrana, i per últim, una altra esponja banyada en tampó de transferència. Després de tancar el cassette, es va col·locar en la cubeta d'electrotransferència, que es va omplir de tampó TG 1X. La transferència es va fer a 90 volts durant 1 hora.

9.5.- Immunodetecció

Quan va acabar la transferència es van rentar les membranes durant 5 minuts en TBS-T (20mM Tris-HCl pH 7.6, 137mM NaCl, 2.6mM KCl, 0.1% Tween-20). Per eliminar les unions inespecífiques es van bloquejar les membranes amb una solució del 5% de llet el pols desnatada en TBS-T durant 1 hora a temperatura ambient.

Després del període de bloqueig, es van rentar les membranes amb TBS-T (3 rentats de 5 minuts) i es van incubar durant tota la nit amb anticòs primari en una solució del 3% de BSA en TBS-T.

La concentració utilitzada dels diferents anticossos es resumeix en la taula següent (Taula 3):

Anticossos Primaris	Tipus d'anticòs	Casa Comercial	Dilució
Anti-NP1	Monoclonal de ratolí	Becton Dickinson	1:1000

Anti-Sinaptofisina	Monoclonal de ratolí	Chemicon	1:1000
Anti-Actina	Policlonal de conill	Sigma	1:3000
Anti-PSD95	Monoclonal de ratolí	Chemicon	1:2500

Taula 3. Anticossos primaris utilitzats.

A continuació es van rentar les membranes amb TBS-T (3 rentats de 5 minuts) i es van incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari corresponent conjugat amb peroxidasa de rave (HRP) (Taula 4). Els secundaris es van utilitzar diluïts en una solució del 5% de llet desnatada en pols en TBS-T.

Anticossos Secundaris	Casa Comercial	Dilució
IgG de Cabra Anti-ratolí-HRP	Cell Signalling	1:10.000
IgG de Cabra Anti-conill-HRP	Cell Signalling	1:5000

Taula 4. Anticossos secundaris utilitzats.

Després de rentar amb TBS-T 3 cops durant 5 minuts, es van preparar les membranes per revelar. El substrat utilitzat per la reacció de quimioluminiscència va ser el SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce), i la detecció de les bandes es va fer amb el sistema VersaDoc 5000 de BioRad. La intensitat de les bandes es va quantificar amb el programa Quantity One, també de BioRad.

Els valors de densitometria de les bandes representatives d'NP1 i sinaptofisina es van normalitzar amb els valors corresponents de l'actina.

10.- COMPROVACIÓ DE L'ESPECIFICITAT DELS ANTICOSSOS CONTRA NP1 I NP2

L'especificitat de diferents anticossos contra NP1 de diferents cases comercials es va verificar contra les proteïnes recombinants de NP1, NP2 i GFP. Vam transfectar

cèl·lules COS-7 amb els vectors d'expressió pCEFL-HA-NP1, el pRK5-HA-NP2 i el vector control pCEFL-hrGFP. Es va fer extracció de proteïnes a partir de les cèl·lules transfectades i es van fer els *western blot* necessaris per tal de fer les deteccions amb els diferents anticossos contra NP1 i NP2 disponibles (Taula 5).

Anticossos Primaris	Tipus d'anticòs	Casa Comercial	Dilució
Anti-NP1	Monoclonal de ratolí	Becton Dickinson	1:1000
Anti-NP1	Policlonal de conill	Becton Dickinson	1:500
Anti-NP1-Cterminal	Policlonal de cabra	Santa Cruz	1:300
Anti-NP1-Nterminal	Policlonal de cabra	Santa Cruz	1:300
Anti-NP2-Cterminal	Policlonal de cabra	Santa Cruz	1:500
Anti-NP2-Nterminal	Policlonal de cabra	Santa Cruz	1:500

Taula 5. Anticossos primaris disponibles contra NP1 i NP2.

Els resultats obtinguts mostren que els dos anticossos de Becton Dickinson, tant el monoclonal com el policlonal, reconeixen específicament la proteïna recombinant de NP1. Mentre que els anticossos de Santa Cruz mostren una significant reactivitat creuada entre les proteïnes recombinants de NP1 i NP2 (Figura 19).

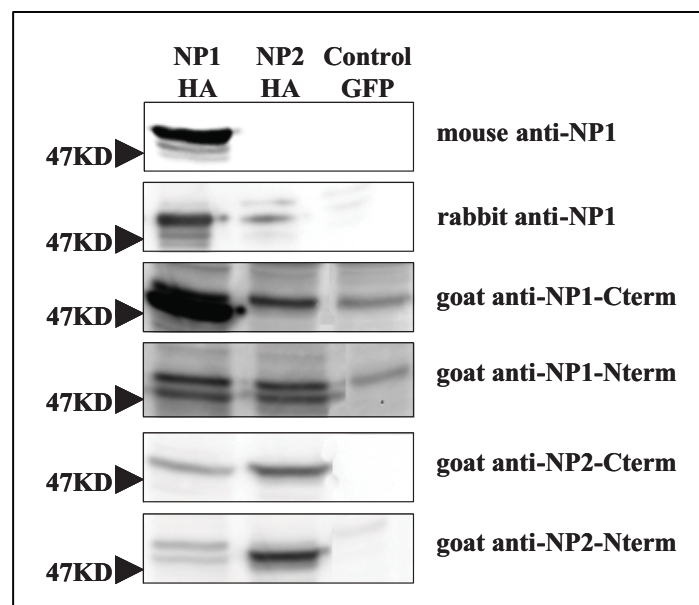


Figura 19. Comprovació de l'especificitat dels diferents anticossos contra NP1 i NP2.

11.- EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE LA PROTEÏNA GST-NP1

Vam subclonar la seqüència codificant de la NP1 entre els llocs de restricció *Bam*HI i *Eco*RI del vector d'expressió pGEX-4T-3 i a continuació del gen que codifica per la glutatió-S-transferasa (GST; Amersham Biosciences). El constructe d'expressió de proteïnes de fusió pGEX-4T-3-GST-NP1 es va transformar en la soca BL21 (DE3) pLys S (Novagen) d'*Escherchia Coli*, i la producció de la proteïna de fusió es va induir afegint IPTG (Isopropyl- β -thiogalactoside) a una concentració final de 0.4mM. Després de 2 hores d'inducció a 37°C, el cultiu de bacteris es va centrifugar. Com la proteïna de fusió es va produir en forma de cossos d'inclusió, el precipitat obtingut després de centrifugar els bacteris es va ressuspendre amb un tampó de sonicació de cossos d'inclusió (25mM HEPES, pH 7.7, 100mM KCl, 12.5mM MgCl₂, 20% Glicerol, 0.1% v/v Nonidet-P-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptina, 2 μ g/ml pepstatina i 4 μ g/ml aprotinina). La dissolució dels cossos d'inclusió es va aconseguir combinant un tractament amb liozima (es va incubar el llisat durant 30 minuts amb 0.5mg/ml liozima), amb cicles de congelació i descongelació i amb una ultrasonicació final. A continuació es va centrifugar el llisat a 8000 xg durant 10 minuts per tal de fer precipitar els cossos d'inclusió. Aquests es van purificar rentant dues vegades amb el tampó d'assaig d'immunoprecipitació (25mM Tris-HCL, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycolate i 1mM PMSF) i es van solubilitzar en 2 volums de 10% SDS. Un cop vam tenir els cossos d'inclusió en solució, la concentració d'SDS es va ajustar a 1% diluint la mostra amb PBS. Per tal de que la proteïna GST-NP1 desnaturalitzada recuperés la seva conformació, la concentració d'SDS es va reduir encara més, fins a 0.01%, per diàlisi seqüencial. Finalment, la GST-NP1 es va purificar

per cromatografia d'afinitat amb una columna de glutatió-sefarosa 4B (Pharmacia Biotech) seguint les instruccions del proveïdor.

12.- PROCESSAT DELS TALLS DE CERVELLS HUMANS

Els cervells de 10 pacients diagnosticats de malaltia d'Alzheimer esporàdica d'aparició tardana i els 8 cervells de pacients d'aproximadament les mateixes edats que no presentaven cap tipus de malaltia neurològica i que es van utilitzar com a controls es van obtenir en l'autòpsia en conformitat amb les línies directrius del Comitè Ètic local de l'Hospital Universitari de Bellvitge i després d'obtenir el consentiment dels seus familiars. El temps transcorregut entre la mort del pacient i el processat del teixit va estar entre 3 i 6 hores tant en els cervells controls com en els que procedien dels malalts d'Alzheimer. Els pacients malalts d'Alzheimer van ser 6 homes i 4 dones amb una mitjana d'edat de 78 anys i en els quals la durada mitja de la malaltia es trobava en els 6.4 anys. Tots ells van morir de manera natural en un estat avançat de la malaltia. Immediatament després de l'extracció del cervell es van fer seccions coronals de l'hemisferi dret del cervell i el cerebel i seccions de 5mm de gruix del tronc encefàlic que es van congelar i guardar a -80°C per realitzar els estudis bioquímics. A més, també es van fer seccions de l'hipocamp i del còrtex entorrinal, així com d'altres regions del cervell, que es van incubar amb 4% paraformaldehid en PBS durant 24 hores, es van rentar amb PBS i es van incloure en parafina per realitzar els estudis d'immunohistoquímica.

Els estudis neuropatològics es van fer en seccions de l'hemisferi dret del cervell, el cerebel i el tronc encefàlic fixades amb formalina i incloses en parafina. Els talls es van tenyir amb hematoxilina i eosina, cresil violeta i Klüver Barrera i van ser processats per tal de fer assaigs immunohistoquímica utilitzant el mètode de l'avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain; Vector Laboratories). Es va estudiar el marcatge dels següents anticossos (Taula 6):

	Tipus d'anticòs	Casa Comercial	Dilució
Anti-Tau-fosforilada	Monoclonal de ratolí Anti-AT8	Innogenetics	1:50
Anti-A β	Monoclonal de ratolí	Sigma	1:30
α -sinucleïna	Monoclonal de ratolí	Chemicon	1:1000

Taula 6. Anticossos utilitzats pels assaigs d'immunohistoquímica.

El teixit va ser pre-tractat amb àcid fòrmic en el cas de les seccions processades per la detecció d'A β i α -sinucleïna. No es van detectar cossos de Lewy, típics en la demència amb cossos de Lewy i en la malaltia de Parkinson, i els casos de malaltia d'Alzheimer es van classificar seguint la classificació de Braak i Braak (Rub et al., 2001) com de fase V i VI, en quant a la patologia neurofibril·lar, i com a fase C, en quant als dipòsits d'A β .

No es va observar patologia tau en cap dels casos control i només es van detectar dipòsits d'A β en un dels casos control. Aquests dipòsits detectats es van limitar a ser unes poques plaques difuses d'A β localitzades a la regió inferior del lòbul frontal i a la regió interna del lòbul temporal, classificat com a fase A segons Braak i Braak (Rub et al., 2001).

12.1.- Immunohistoquímica de NP1

Els talls es van processar seguint el mètode de tinció per avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain, Vector Laboratories). Primerament, les seccions es van bullir en tampó citrat per tal d'exposar els antígens i que estiguessin disponibles als anticossos, i després es van mantenir a temperatura ambient durant tota la nit. Un cop bloquejada la peroxidasa endògena, els talls es van incubar amb sèrum normal i a continuació es van incubar amb un dels anticossos primaris a 4°C durant tota la nit. L'anticòs policlonal de conill contra la NP1 es va utilitzar a una dilució 1:1000. Per tal de provar l'especificitat de l'anticòs, alguns talls es van incubar amb l'anticòs de conill anti-NP1 preabsorbit amb la proteïna recombinant GST-NP1. Com a control negatiu i per detectar possibles causes de l'aparició de soroll de fons, unes altres seccions es van incubar només amb l'anticòs secundari. Després de la incubació amb l'anticòs primari, els talls es van

incubar durant 1 hora amb l'anticòs biotinilat IgG anti-conill a una dilució 1:100, seguit d'una incubació d'una hora a temperatura ambient amb l'ABC a una dilució 1:100. La reacció de la peroxidasa es va visualitzar amb 0.05% diaminobenzidina i 0.01% de peròxid d'hidrogen que va donar lloc a l'aparició d'un precipitat marró. Alguns talls es van visualitzar amb NH_4NiSO_4 (0.05M) en tampó fosfat (0.1M), diaminobenzidina, NH_4Cl i peròxid d'hidrogen, amb el que apareixia un precipitat blau fosc. Els teixits control i els procedents de malalts d'Alzheimer van ser processats en paral·lel per tal d'evitar les possibles variacions del procediment de tinció degudes al processament en diferents dies. Alguns dels talls van ser marcats amb un anticòs monoclonal de ratolí contra SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25KDa; Abcam) utilitzat a una dilució d'1:1000. La immunoreacció es va visualitzar amb 0.05% diaminobenzidina i 0.01% de peròxid d'hidrogen i els talls van contrastar posteriorment tenyint amb hematoxilina.

Els assaigs d'immunohistoquímica doble van ser duts a terme seguint un protocol de dos passos en el qual els talls van ser incubades en primer lloc amb l'anticòs contra NP1 i la immunoreacció es va visualitzar amb diaminobenzidina i peròxid d'hidrogen tal i com s'ha explicat anteriorment. Subseqüentment els talls es van incubar amb l'anticòs AT8 (Innogenetics) a una dilució 1:50 i l'immunocomplex es va visualitzar amb 0.01% hidroclorat de benzidina, 0.025% de nitroferrocianida de sodi en 0.0001% M de tampó fosfat de sodi, pH 6.0, i 0.005% de peròxid d'hidrogen o amb NH_4NiSO_4 (0.05M) en tampó fosfat (0.1M), diaminobenzidina, NH_4Cl i peròxid d'hidrogen.

12.2.- Immunofluorescència de NP1 i microscopia confocal

Els talls d'hipocamp desparafinats es van tenyir amb una solució saturada de Negre Sudan B (Merck) durant 30 minuts per tal de bloquejar l'autofluorescència dels grànuls de lipofucsina que estan presents en els cossos cel·lulars de les neurones, es va passar 70% etanol per els talls i es van rentar amb aigua destil·lada. A continuació es van incubar les seccions durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs policlonal anti-NP1 a una dilució d'1:100 i amb un anticòs monoclonal anti-A β a una dilució 1:30 en una solució composta per tampó Tris, pH 7.2, amb 15mM NaN_3 i proteïna (Dako). Després de rentar amb PBS, els talls es van incubar durant 45 minuts a temperatura ambient i a la foscor amb els anticossos secundaris diluïts en la mateixa solució que els primaris. Unes altres seccions es van incubar amb l'anticòs anti-NP1 a una dilució d'1:100 i amb

l'anticòs monoclonal contra SNAP-25 (Abcam) a una dilució 1:1000. Els anticossos secundaris utilitzats van ser Alexa 488 anti-conill (verd) i Alexa 546 anti-ratolí (vermell) (Invitrogen), diluïts a 1:400. Després de rentar amb PBS, els talls es van muntar amb el medi de muntatge immuno-Fluore (ICN Biomedicals), es van segellar i es van deixar secar durant la nit. Les seccions es van analitzar en un microscopi confocal Leica TCS-SL.

13.- ASSAIG DE WESTERN BLOT DE LES PROTEÏNES EXTRETES A PARTIR DELS CERVELLS HUMANS

Els anàlisi de *western blot* es van realitzar a partir de mostres congelades de l'hipocamp dels mateixos casos. Les mostres es van homogeneïtzar en un tampó que contenia: 100mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 1% deoxicolat de sodi, 0.1% SDS, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 5mg/ml aprotinina, 5mg/ml leupeptina i 5mg/ml pepstatina (Sigma). A cada pou es va carregar la mateixa quantita de proteïnes (10 o 20mg) amb el tampó de càrrega (0.125mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glicerol, 10% mercaptoetanol, 4% SDS i 0.002% de blau de bromofenol). Les mostres es van escalfar a 95°C durant 10 minuts abans de carregar-les en el gel. Per separar les proteïnes es van utilitzar gels desnaturalitzants de poliacrilamida i es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del sistema de transferència Semi-Seca de BioRad (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell) a 40mA durant 1 hora. A continuació, les membranes es van bloquejar amb TBS amb 0.05% de Tween 20, 5% de llet, 2% BSA (Sigma) i 1% de sèrum normal (Vector Laboratories). En experiments anteriors es va veure que l'anticòs monoclonal de ratolí contra NP1 no reconeixia la NP1 humana, així que en posteriors immunodeteccions es va utilitzar l'anticòs policlonal de conill anti-NP1 (Becton Dickinson). Les membranes es van incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs contra NP1 a una dilució 1:200. Després de fer 3 rentats amb TBS-T, les membranes es van incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari corresponent (anti-conill IgG) conjugat amb

peroxidasa de rave (Dako) a una dilució 1:1000. Les membranes es van tornar a rentar i a continuació es van revelar utilitzant el sistema quimioluminiscent ECL d'Amersham Biosciences. La intensitat de les bandes en les pel·lícules d'autoradiografia (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences) es va quantificar per densitometria i així es van poder comparar els diferents casos. Els valors densitomètrics de les bandes d'NP1 es van normalitzar amb els valor de les bandes de β -actina, que es va utilitzar com a control de càrrega. Els casos control i els de malalts d'Alzheimer es van processar en paral·lel. L'especificitat de l'anticòs de conill contra NP1 es va confirmar per la preabsorció de l'anticòs amb la proteïna recombinant GST-NP1.

14.- RATOLINS TRANSGÈNICS PER LA PROTEÏNA PRECURSORA AMILOIDEA MUTANT I PRESENILINA 1 (APP/PS1)

Els ratolins transgènics APP/PS1 es van obtenir de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Als 12 mesos d'edat se'ls hi va realitzar una perfusió transcardíaca amb salí, seguida d'una perfusió amb 4% paraformaldehid en PBS. A continuació es va separar el cervell del crani i el cervell es va submergir en la mateixa solució fixadora durant 24 hores. Un cop fixats es van submergir en una solució crioprotectora amb 30% sucrosa i es van congelar a -80°C . Es van fer talls de $10\mu\text{m}$ amb el criostat i amb aquests talls es va fer immunohistoquímica en flotació seguint el mètode ABC segons s'explica anteriorment amb els anticossos contra $A\beta$, NP1 i tau fosforilada en Thr¹⁸¹ (Calbiochem) a una dilució d'1:250. La immunoreactivitat es va visualitzar amb NH_4NiSO_4 (0.05M) en tampó fosfat (0.1M), diaminobenzidina, NH_4Cl i peròxid d'hidrogen. Les plaques d' $A\beta$ estaven presents en el còrtex cerebral i a l'hipocamp d'aquests ratolins transgènics però no en els companys de camada de la mateixa edat corresponents.

15.- MESURA DE LA CONCENTRACIÓ INTRACEL·LULAR DE CALCI EN LES CÈL·LULES CORTICALS TRANSDUIDES

Els cultius de cèl·lules corticals es van plaquejar en cubre-objectes i es van transduir amb el lentivirus control de silenciament (shARNi-Random) o el lentivirus de silenciament de NP1 (shARNi-NP1) a DIV0. Un cop les neurones van ser madures es va procedir a realitzar l'experiment de mesura de calci intracel·lular. Les cèl·lules corticals es van rentar dos cops amb el tampó Locke-Hepes 1X (154mM NaCl, 5.6mM KCl, 3.6mM NaHCO₃, 5.6mM D-Glucosa, 10mM Hepes i 1.3mM CaCl₂) per tal de retirar tot el vermell de fenol del medi i a continuació es van incubar durant 1h a 37°C i 5% CO₂ amb 5µg/ml de Fura-2 (Molecular Probes, Invitrogen). Passat aquest temps es van realitzar 3 rentats amb el Locke-Hepes 1X per treure el Fura-2 en excés i es va muntar el cubre-objectes a la cambra del microscopi de fluorescència. Per analitzar la concentració intracel·lular de calci es va utilitzar el programa *Aquacosmos* que registra la fluorescència que emet el Fura-2 a dues longituds d'ona diferents: 340nm, moment en que aquest compost està unit a calci, i 380nm, quan el Fura-2 està lliure de les cèl·lules que seleccionem. Aquest programa realitza aquestes mesures al llarg del temps, fet que permet tenir una valoració de les oscil·lacions dels nivells de calci intracel·lular durant tot l'experiment. Una vegada obtingudes les dades a 340 i 380nm es va fer una proporció entre els valors de fluorescència a aquestes longituds d'ona en cada interval de temps.

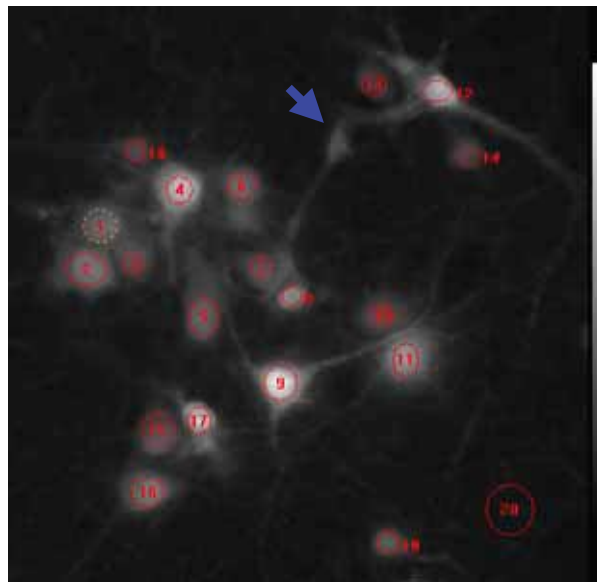


Figura 20. Imatge de fluorescència de cèl·lules corticals transduïdes amb shARNi-NP1 marcades amb Fura-2. Només es van seleccionar per a ser registrades aquelles cèl·lules que eren GFP positives. La fletxa blava senyalitza una cèl·lula marcada amb

Fura-2 però no transduïda que no es va analitzar. La regió 20 indica la mesura del soroll de fons que es va realitzar per cada camp analitzat.

1.- A β ACTIVA EL PROGRAMA DE MORT NEURONAL APOPTÒTICA EN CÈL·LULES CORTICALS EN CULTIU

Estudis previs d'altres laboratoris en cultius neuronals han mostrat que el fragment sintètic A β 25-35 té els mateixos efectes neurotòxics que el pèptid sencer, l'A β 1-42, i que indueix la mort de les neurones corticals de manera concentració-dependent [(Yankner et al., 1990);(Pike et al., 1995) i (Morishima et al., 2001)]. Així, abans d'estudiar la relació entre la neurotoxicitat induïda per A β i l'expressió de NP1, vam tractar els cultius primaris de neurones corticals de rata amb A β 25-35 a una concentració de 30 μ M, una concentració que ja s'ha vist que indueix una mort cel·lular màxima en aquest tipus de neurones (Morishima et al., 2001). El tractament dels cultius corticals amb el pèptid A β 25-35 30 μ M va provocar un increment de la mort neuronal, de manera temps-dependent, mesurat per intensitat de fluorescència després de la incorporació de IP. La pèrdua de viabilitat neuronal induïda per l'A β 25-35 va arribar aproximadament al 65% després de 48h de tractament mentre que, al mateix temps, els cultius control presentaven un 16% de mort cel·lular (Figura 21).

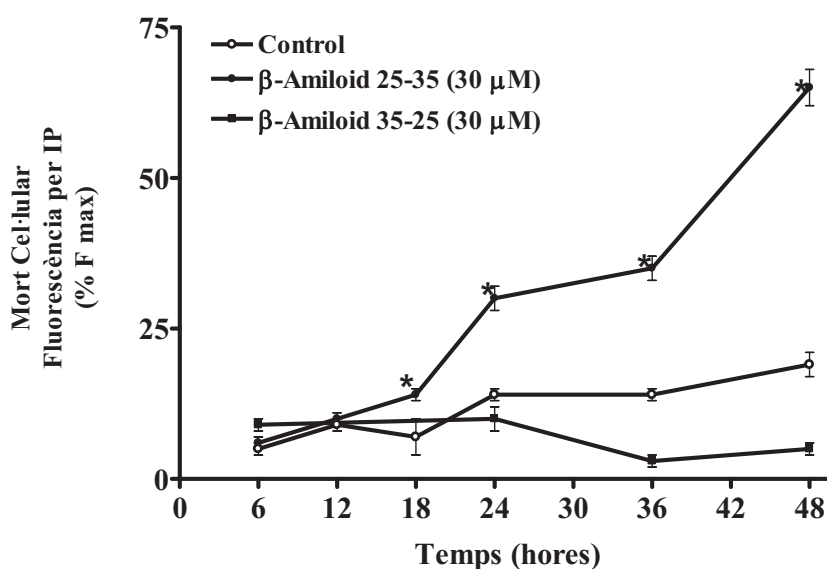


Figura 21. Curs temporal de l'efecte d'A β 25-35 30 μ M sobre la mort neuronal. Viabilitat neuronal mesurada mitjançant fluorescència per Iodur de Propidi i expressada com a percentatge respecte la mort neuronal màxima obtinguda pel tractament amb digitonina. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

No obstant, aquest efecte neurotòxic de l'A β 25-35 no va ser significativament diferent del control fins les 18h de tractament (Figura 21). El tractament amb el pèptid invers A β 35-25 no va induir cap efecte neurotòxic significatiu, ja que després de 48h de tractament els cultius presentaven un 19% de mort cel·lular (Figura 21), el que indica que l'efecte neurotòxic del fragment 25-35 és específic.

S'ha vist que les formes oligomèriques solubles de l'A β sintètic són capaces de matar les cèl·lules de neuroblastoma Neuro-2A i les neurones madures de cultius organotípics procedents de teixit del sistema nerviós central [(Lambert et al., 1998) i (Dahlgren et al., 2002)]. A més, estudis recents han mostrat que la oligomerització de l'A β endogen es troba associada al dany neurític i sinàptic de cèl·lules corticals de ratolí en cultiu i de cervells de malalts d'Alzheimer (Takahashi et al., 2004). A la vegada, en diferents estudis neuropatològics s'ha vist que el que correlaciona amb el dany neuronal i el grau de demència en malalts d'Alzheimer és la quantitat d'A β soluble i no la quantitat d'A β agregat a les plaques [(Lue et al., 1999) i (McLean et al., 1999)]. Per aquestes raons vàrem decidir estudiar la neurotoxicitat de les formes oligomèriques solubles d'A β 1-42 exogen en cèl·lules corticals en cultiu.

El tractament de les cèl·lules corticals amb A β 1-42 oligomèric va induir una reducció de la viabilitat neuronal de manera temps i concentració-dependent (Figures 22 i 23). La concentració mínima efectiva d'A β 1-42 que va induir un increment significatiu del percentatge de nuclis apoptòtics respecte el control va ser la de 100nM, mentre que l'efecte neurotòxic màxim el vàrem obtenir amb la concentració de 10 μ M (Figura 22).

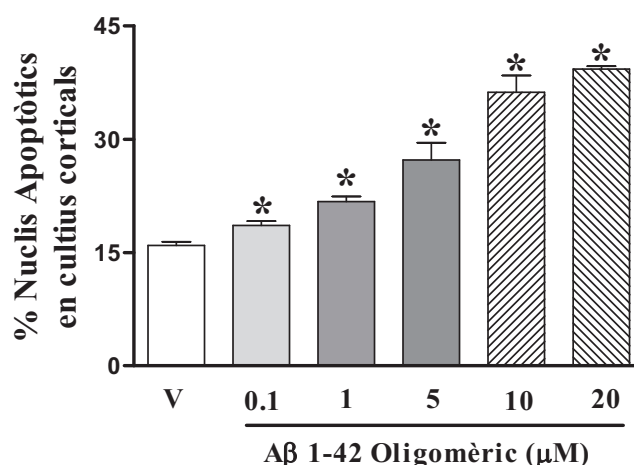


Figura 22. $A\beta$ 1-42 oligomèric indueix un increment de nuclis apoptòtics de manera concentració-dependent. Els nuclis condensats es van comptar per tinció amb Hoechst 33258 48h després de l'inici del tractament. $*p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

Amb $A\beta$ 1-42 100nM vàrem obtenir un 19% de nuclis apoptòtics i amb l' $A\beta$ 1-42 10 μ M un 37% respecte el 15% observat en el tractament control després de 48h de tractament (Figura 22). També vàrem realitzar assaigs de curs temporal mitjançant fluorescència per IP amb la concentració d' $A\beta$ 1-42 màxima (10 μ M) i vam veure que l'efecte del pèptid depenia del temps i que no era significatiu fins a les 24h de tractament (Figura 23).

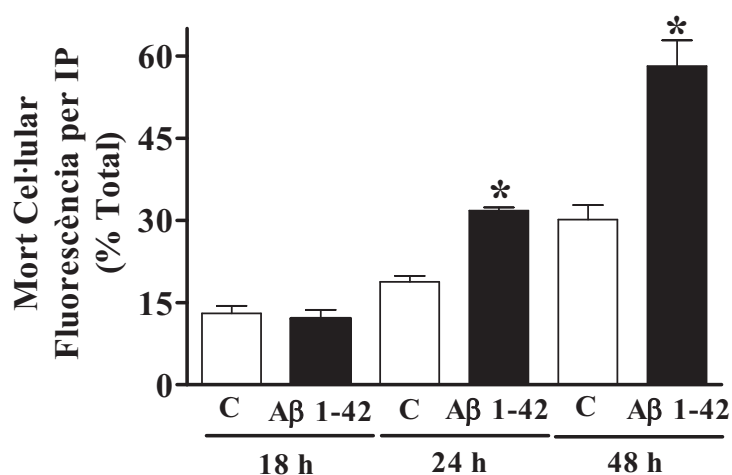


Figura 23. Curs temporal de la neurotoxicitat induïda per $A\beta$ 1-42 oligomèric 10 μ M. Mort neuronal mesurada per comptatge del nombre de nuclis tenyits per Iodur de Propidi respecte el nombre total de cèl·lules comptades per contrast de fases. $*p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

Les mesures de l'efecte neurotòxic d' $A\beta$ 1-42 sobre les neurones corticals van donar valors més alts en els assaigs de IP que en els de quantificació de nuclis condensats per tinció amb Hoechst. Per exemple, l'exposició de les cèl·lules corticals a la concentració de 10 μ M d' $A\beta$ 1-42 durant 48h va induir un increment de l'ordre del 50-65% de la fluorescència per IP (Figura 23), mentre que el mateix tractament va produir un

increment dels nuclis apoptòtics del 35-50% (Figura 22). Això és degut a que el IP marca les cèl·lules que tenen la membrana citoplasmàtica malmesa i proporciona una estimació de les cèl·lules que moren a través de diferents processos, tant apoptosi com necrosi. Per contra, el percentatge de nuclis condensats, com és una característica morfològica de l'apoptosi, dona únicament una mesura de les cèl·lules que moren per apoptosi.

Aquests resultats que mostren que l'A β 1-42 produeix un increment major de la mort cel·lular que de nuclis apoptòtics és consistent amb estudis previs que mostren que l'A β 1-42 podria donar lloc tant a la mort per apoptosi com a la mort per necrosi en neurones en cultiu segons la concentració i el temps d'exposició utilitzats (Wei et al., 2002).

La mort per apoptosi sovint requereix l'activació de la caspasa-3 que es produeix per la proteòlisi del seu zimogen inactiu en fragments actius. Per tal de veure si la morfologia apoptòtica que observàvem en els cultius de corticals després del tractament amb A β 1-42 està associada amb l'activació de la caspasa-3, vàrem realitzar estudis d'immunofluorescència utilitzant un anticòs que només reconeix la forma activa d'aquest enzim (Figura 24).

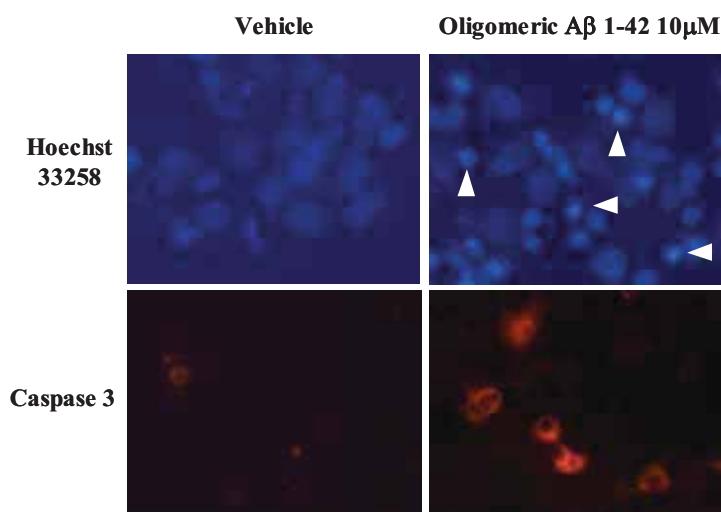


Figura 24. Imatges representatives de neurones corticals control i tractades amb A β 1-42 10 μ M durant 48h i tenyides amb Hoechst 33258 (a dalt) i Caspasa 3 activa (a baix). Les fletxes senyalen els nuclis condensats. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

En les immunfluorescències contra caspasa 3 activa vàrem veure que el tractament amb els oligòmers d'A β 1-42 durant 48h indueix un increment del percentatge de cèl·lules amb caspasa 3 activa, s'observa un 15 \pm 3% en comparació a un 3 \pm 0.5% en el tractament control (Figura 25).

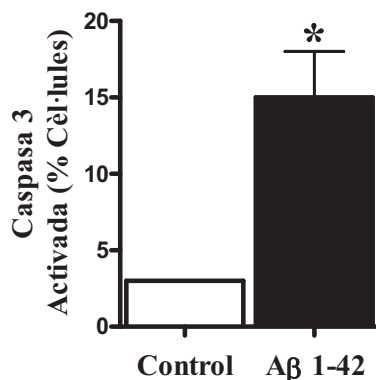


Figura 25. Efecte del tractament de les neurones corticals amb A β soluble 10 μ M durant 48h. Comptatge de cèl·lules marcades en immunofluorescència contra caspasa 3 activa. * p <0.05, significativament diferent del tractament control.

2.- A β INCREMENTA L'EXPRESSION DE NP1 ABANS D'INDUIR MORT NEURONAL

Un cop caracteritzada la toxicitat induïda pel pèptid A β , vàrem estudiar l'expressió de NP1 en extractes cel·lulars de neurones corticals en el període anterior a que l'A β indueix dany a la membrana i mort neuronal, ja que és en aquest interval de temps quan s'activa el programa de mort. L'efecte de l'A β , tant del fragment 25-35 com de l'1-42, sobre l'expressió de NP1 es va estudiar en funció del temps de tractament amb el pèptid (Figures 26 i 28).

El tractament amb A β 25-35 no va alterar els nivells de NP1 durant les 8 primeres hores, però l'expressió de NP1 va incrementar fins al 327 \pm 48% respecte els valors controls després de les 12h d'exposició al pèptid. Aquest increment dels nivells de NP1 induït pel tractament amb A β 25-35 es va mantenir fins les 18h i no va començar a disminuir fins després de les 24h de tractament (Figura 26 i 27). Per contra, els nivells de l'actina, que es van utilitzar com a control de càrrega, no van variar de manera significativa entre els diferents tractaments amb A β 25-35 (Figura 26).

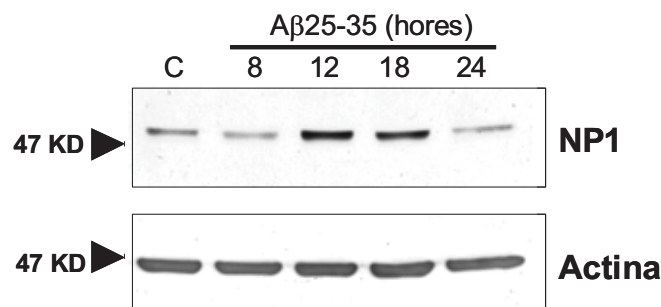


Figura 26. Western blot representatiu dels nostres resultats mostrant l'efecte del tractament de les corticals amb Aβ25-35 30μM sobre l'expressió de NP1 al llarg de les hores de tractament. Els westerns es van incubar amb l'anticòs contra NP1 i l'actina es va utilitzar com a control de càrrega.

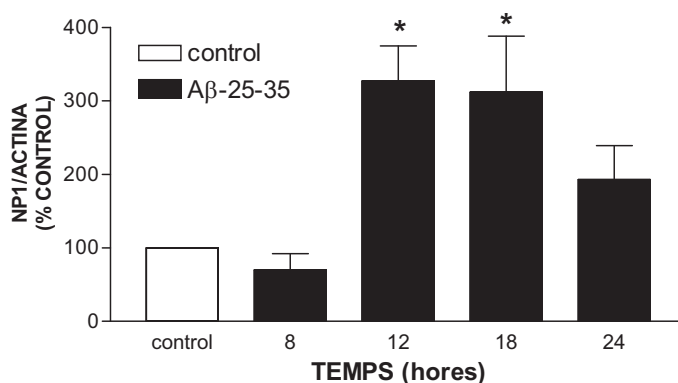


Figura 27. Anàlisi quantitativa de l'efecte d'Aβ25-35 30μM sobre els nivells de NP1. Els valors densitomètrics de les bandes de NP1 es van normalitzar amb els valors de les bandes d'actina corresponents. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

A continuació vàrem investigar l'efecte dels oligòmers d'Aβ1-42 sobre l'expressió de NP1. L'exposició de les cèl·lules corticals als oligòmers d'Aβ1-42 va induir un increment dels nivells de NP1 de manera concentració-dependent, ja que a la concentració de 10μM vàrem observar un increment del $166 \pm 12\%$ i a la de 20μM d'un $194 \pm 27\%$ respecte els valors del control, encara que aquest increment no es produí fins a les 18h després de l'exposició al pèptid (Figures 28 i 29).

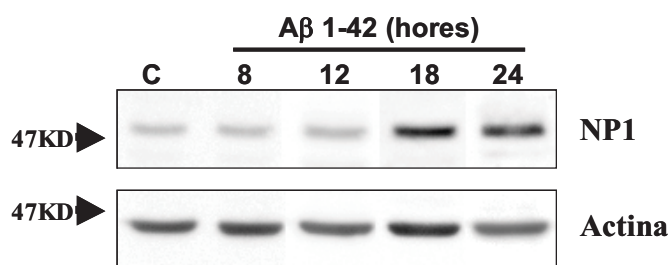


Figura 28. Western blot representatiu dels nostres resultats mostrant l'efecte del tractament de les corticals amb una concentració màxima d'Aβ1-42 (20μM) sobre l'expressió de NP1 al llarg de les hores de tractament. Els westerns es van incubar amb l'anticòs contra NP1 i l'actina es va utilitzar com a control de càrrega.

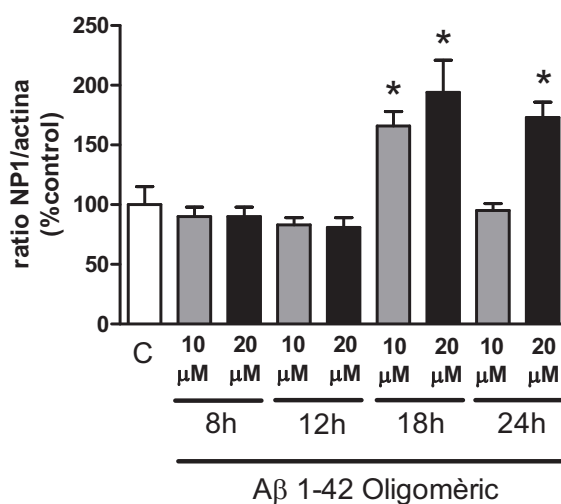


Figura 29. Anàlisi quantitativa de l'efecte d'Aβ1-42 10 i 20μM sobre els nivells de NP1. Els valors densitomètrics de les bandes de NP1 es van normalitzar amb els valors de les bandes d'actina corresponents. La proporció de NP1 respecte actina s'expressa com a percentatge respecte els valors control. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

En comparació amb l'Aβ25-35, l'increment dels nivells de NP1 després de l'exposició a l'Aβ1-42 va ser més tardà, i va ser significativament inferior a les 24h després del començament del tractament (Figures 27 i 29). Experiments posteriors van mostrar que l'efecte de l'Aβ1-42 a la concentració de 20μM sobre l'expressió de NP1 era sostingut i que arribava a incrementar un $458 \pm 77\%$ respecte el control, fins a les 60h després del començament del tractament.

Encara que ja vàrem observar un increment en l'expressió de NP1 a partir de les 18h de tractament amb A β 1-42 (Figura 29), la mort neuronal no era significativa fins a les 24h de tractament (Figura 23), el que indica clarament que l'A β 1-42 indueix la sobreexpressió de NP1 abans d'induir mort cel·lular.

3.- EL SILENCIAMENT DE LA SOBREEPRESSIÓ DE NP1 RESCATA A LES NEURONES CORTICALS DE LA MORT APOPTÒTICA INDUÏDA PER A β 1-42

Per tal d'estudiar si la sobreexpressió de NP1 és necessària per que es produeixin els efectes neurotòxics del pèptid A β 1-42, vam decidir reduir l'expressió de NP1 mitjançant dues estratègies diferents. La primera consistia en l'ús d'oligodeoxinucleòtids antisentit i la segona en la transducció d'un shARNi mitjançant la infecció amb lentivirus. Aquestes dues estratègies de silenciament de expressió van dirigides contra l'ARN missatger de la NP1.

En estudis previs del nostre laboratori vàrem mostrar que els ODNs antisentit (NP1AS), però no els sentit (NP1S) redueixen de manera significativa els nivells de NP1 en les neurones (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). Utilitzant aquests mateixos ODNs vàrem observar que el pre-tractament de les neurones corticals amb els NP1AS, però no amb els NP1S, bloqueja completament l'aparició tant dels nuclis apoptòtics (Figura 30) com l'aparició de cèl·lules amb la caspasa-3 activa (Figura 31) 48h després del tractament amb A β 1-42 oligomèric.

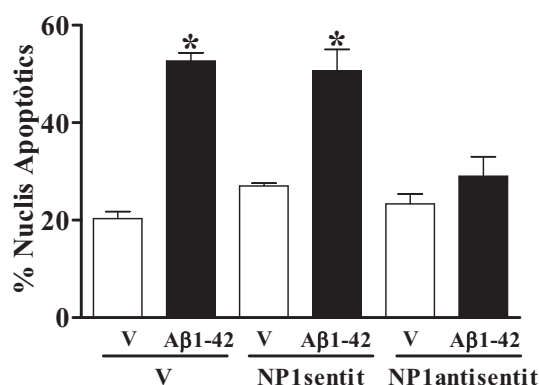


Figura 30. Efecte de la transfecció de les neurones corticals amb NP1S i NP1AS sobre el tractament amb A β 1-42 10 μ M. La tinció amb Hoechst 33258 i el comptatge de nuclis

apoptòtics es va realitzar 48h després de l'inici del tractament amb A β 1-42. * p <0.05, significativament diferent del tractament control.

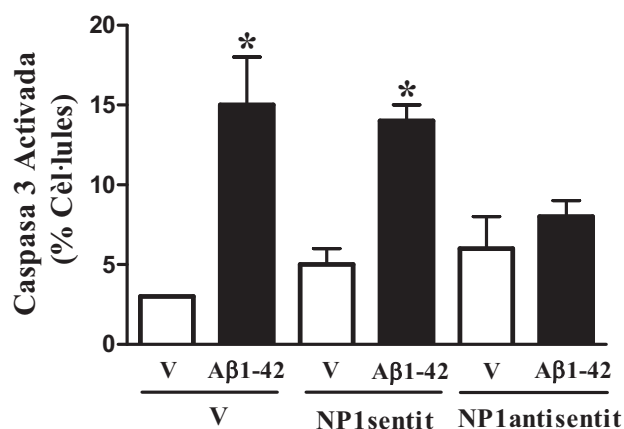


Figura 31. Efecte de la transfecció de les neurones corticals amb NP1S i NP1AS sobre el tractament amb A β 1-42 10 μ M. La immunofluorescència contra caspasa 3 activada es va realitzar 48h després de l'inici del tractament amb A β 1-42. * p <0.05, significativament diferent del tractament control.

Aquest fenomen va ser confirmat quan vàrem silenciar l'expressió de NP1 mitjançant ARNi. La transducció d'un shARNi dirigit contra l'ARN missatger de la NP1 mitjançant l'ús de lentivirus ens va permetre silenciar de manera molt significativa la sobreexpressió de NP1 induïda per el tractament amb A β 1-42 oligomèric (Figura 32). Vàrem observar que aquest efecte era específic ja que la transducció d'un shARNi expressant una seqüència a l'atzar no va tenir cap efecte sobre els nivells de NP1 (Figura 32).

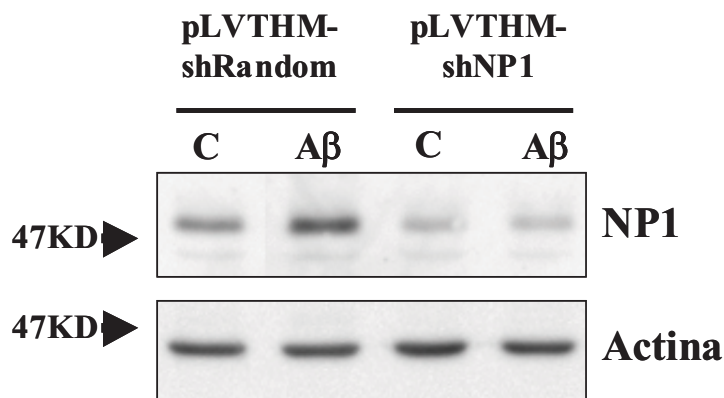


Figura 32. Western blot representatiu mostrant la reducció específica dels nivells de NP1 després de la transducció amb el lentivirus shARNi-NP1. Les proteïnes es van extreure 18h després del tractament amb A β 1-42 10 μ M.

A més, la transducció dels shARNi-NP1, però no dels shARNi-Random, va bloquejar l'aparició de nuclis apoptòtics 48h després de l'exposició de les neurones corticals a l'A β 1-42 oligomèric (Figura 33).

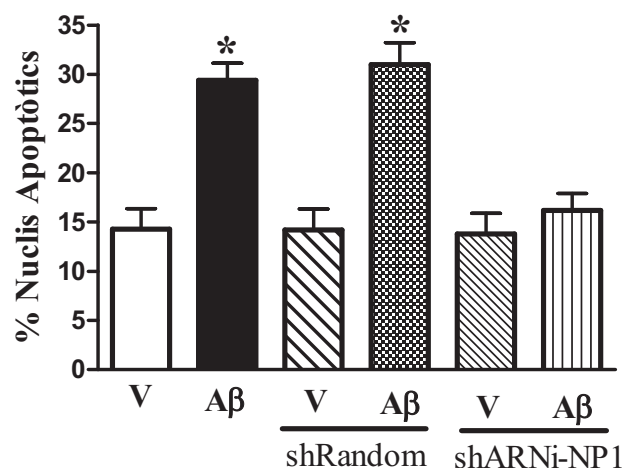


Figura 33. Efecte del tractament amb A β 1-42 10 μ M durant 48h sobre l'aparició de nuclis apoptòtics en les neurones corticals transduïdes amb pLVTHM-shRandom i pLVTHM-shNP1. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

Aquests resultats indiquen clarament que la NP1 és necessària per tal de que s'activi el programa de mort induït pel tractament amb A β 1-42.

4.- LA NP1 ÉS NECESSÀRIA PER LA REDUCCIÓ DEL CREIXEMENT NEURÍTIC INDUÏT PER A β 1-42

En estudis previs s'ha vist que la degeneració neurítica induïda per A β 1-42 en neurones en cultiu presenta les característiques morfològiques i bioquímiques de l'apoptosi (Ivins et al., 1998). El dany neurític és un dels primers esdeveniments que té lloc al llarg del procés de mort cel·lular induït per diferents estímuls apoptòtics. Com hem vist que la NP1 és necessària pels efectes d'A β 1-42 sobre la mort neuronal apoptòtica, vàrem investigar el paper de la NP1 en la degeneració neurítica induïda per A β 1-42. En la

primera sèrie d'experiments, vàrem estudiar l'efecte de l'A β 1-42 sobre el creixement neurític per immunofluorescència de la xarxa de tubulina (Figura 34).

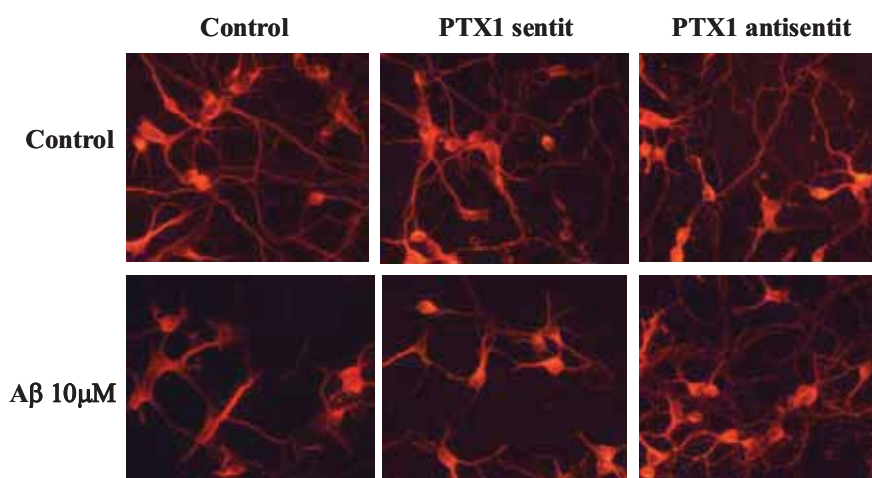


Figura 34. Imatges corresponents a una immunofluorescència de la xarxa de tubulina de neurones corticals en cultiu transfectades amb els ODNs sentit i antisentit i tractades amb A β 10 μ M durant 48h.

El tractament de cultius de neurones corticals plaquejats a baixa densitat amb A β 1-42 10 μ M durant 48h va produir una reducció molt significativa, d'aproximadament el 30%, de la llargària de les neurites desenvolupades per les neurones (Figura 35). Tal i com es veu a la figura 35, en els cultius control vàrem obtenir una llargària mitja de les neurites de 217 \pm 10 μ M, mentre que en els cultius tractats amb A β 1-42 la mitja de la llargària era de 150 \pm 11 μ M.

A més, vam veure que la reducció de la longitud neurítica induïda per A β 1-42 era antagonitzada pel pre-tractament amb els NP1AS, però no amb els NP1S (Figura 35). Aquests resultats indiquen que la NP1 també és un factor clau en l'efecte neurotòxic d' A β 1-42 de reduir el creixement neurític.

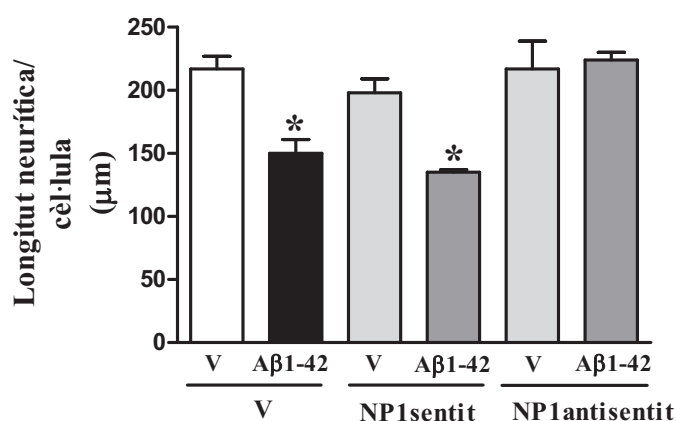


Figura 35. Gràfica corresponent a la mitja de la longitud neurítica total observada en les immunofluorescències de la xarxa de tubulina de les neurones corticals transfectades amb ODNs sentit i antisentit després del tractament amb $A\beta$ $10\mu\text{M}$ durant 48h. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

També vam investigar el paper de la NP1 en el dany neurític induït per $A\beta$ 1-42 silenciant l'expressió de NP1 mitjançant la tècnica de l'ARN d'interferència (Figura 36 i 37).

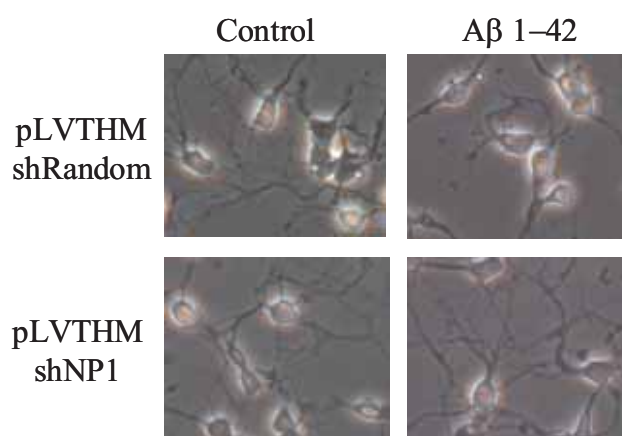


Figura 36. Imatges representatives de contrast de fases de neurones corticals transduïdes amb els lentivirus shRandom i shNP1 i tractades amb $A\beta$ $10\mu\text{M}$ durant 24h.

En aquests experiments vàrem mesurar la longitud neurítica a partir d'imatges de contrast de fases i vam veure que l' $A\beta$, a la concentració de $10\mu\text{M}$, indueix una reducció del 36% de la llargària de les neurites 24h després de l'inici del tractament. En

les cèl·lules control observem una llargària mitja de $215 \pm 12 \mu\text{m}$ respecte les $137 \pm 9 \mu\text{m}$ de les cèl·lules tractades amb $A\beta$ (Figura 37). En aquest cas també vam veure que en silenciar l'expressió de NP1 mitjançant la transducció de l'shRNAi-NP1, però no de l'shRNAi-Random, s'aconsegueix bloquejar de manera molt significativa l'efecte neurotòxic induït pel tractament amb $A\beta$ (Figura 36 i 37).

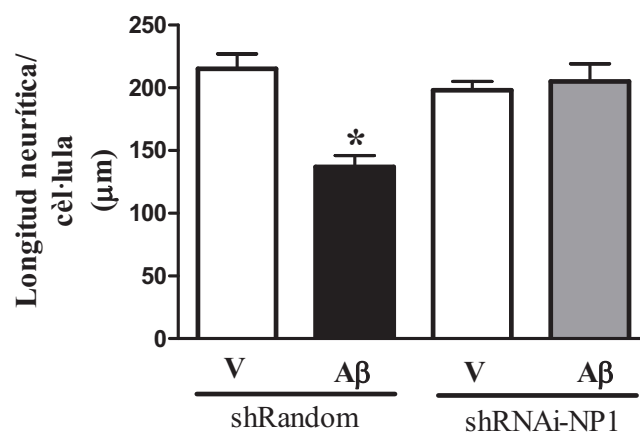


Figura 37. La longitud neurítica total es va obtenir a partir del comptatge de les neurites de les neurones corticals transduïdes amb els lentivirus shRandom i shNP1 i tractades amb $A\beta$ 1-42 $10 \mu\text{M}$ durant 24h. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

Per tal de determinar si aquest efecte d' $A\beta$ sobre la longitud neurítica també es dona en les dendrites, en primer lloc vam estudiar l'estat de diferenciació en el que es trobaven les nostres cèl·lules corticals de 5DIV en cultiu. Vam realitzar experiments d'immunofluorescència doble utilitzant els anticossos contra MAP2 (2a+2b), que marca les dendrites, i sinapsina I, que marca els terminals sinàptics. En imatges obtingudes mitjançant microscopia confocal vam veure que la MAP2(2a+2b) es troba segregada en les dendrites que es troben envoltades pels *puncta* de sinapsina, el que indicaria que les nostres neurones corticals en cultiu es troben polaritzades a 5DIV (Figura 38).

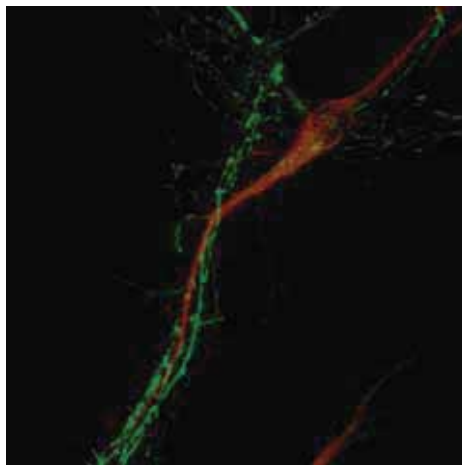


Figura 38. Imatge d'immunofluorescència contra sinapsina I, per marcar sinapsis, i MAP2(2a+2b), per marcar dendrites, en cèl·lules corticals de 5DIV per tal de verificar la maduresa o l'estat de diferenciació dels cultius en el moment de fer els experiments.

Estudis subsequents van mostrar que l'exposició a $A\beta$ 1-42 $10\mu\text{M}$ redueix la llargària de les dendrites i que aquest efecte es bloqueja pel silenciament de l'expressió de NP1 amb la transducció de l'shARNi-NP1 (Figura 39).

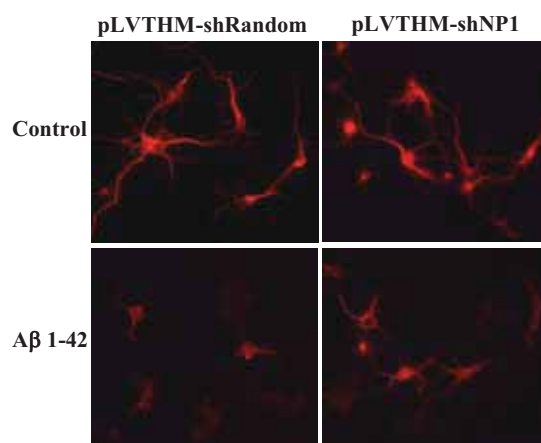


Figura 39. Efecte d' $A\beta$ $10\mu\text{M}$ oligomèric durant 72h sobre les dendrites de les neurones corticals transduïdes amb els lentivirus shRandom i shNP1.

5.- EL SILENCIAMENT DE L'EXPRESSIÓ DE NP1 BLOQUEJA LA PÈRDUA SINÀPTICA INDUÏDA PER A β

Estudis previs del grup de Masliah han demostrat que la pèrdua sinàptica és un procés que té lloc en els estadis primerencs de la malaltia d'Alzheimer (Masliah et al., 2001). Per tal d'analitzar si la reducció en la llargària neurítica induïda pel tractament amb A β es troba associada a una pèrdua de sinapsi i per comprovar si aquest efecte també està mediat per l'expressió de NP1, vam estudiar l'efecte de l'A β 1-42 oligomèric sobre els nivells de sinaptofisina, que és una proteïna que es troba a les vesícules pre-sinàptiques. El tractament de les neurones corticals en cultiu amb 20 μ M A β 1-42 durant 48h indueix una reducció molt significativa, d'aproximadament un 60%, dels nivells de sinaptofisina. Aquest efecte neurotòxic d'A β es bloqueja amb la transducció de l'shARNi que silencia l'expressió de NP1, shARNi-NP1, però no amb la transducció de la forqueta control shARNi-Random (Figures 40 i 41).

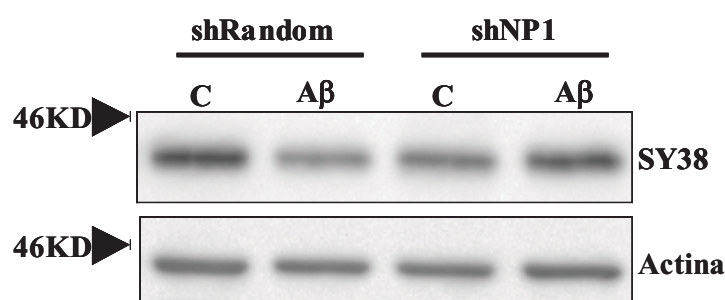


Figura 40. *Western blot representatiu mostrant la reducció dels nivells de sinaptofisina després del tractament de les neurones corticals amb A β 1-42 20 μ M durant 48h i la recuperació dels nivells de sinaptofisina mitjançant la transducció amb el lentivirus shARNi-NP1. La actina es va utilitzar com a control de càrrega.*

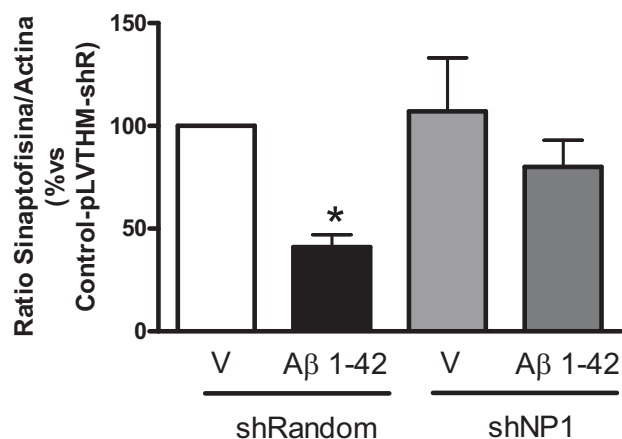


Figura 41. Anàlisi quantitatiu de l'efecte d'A β 1-42 20 μ M 48h sobre els nivells de sinaptofisina de les cèl·lules corticals en cultiu. La transducció amb els lentivirus shNP1 bloqueja l'efecte d'A β sobre la pèrdua sinàptica. Els valors de densitometria de les bandes de sinaptofisina es van normalitzar amb els valors de densitometria de les bandes d'actina corresponents. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

6.- LA SOBREEXPRESSION DEL TRANSGEN DE NP1 REPRODUUEIX ELS EFECTES NEUROTÒXICS D'A β PEL QUE FA AL DANY NEURÍTC I L'APOPTOSI

Per tal de determinar si la NP1 per si sola era capaç de reproduir els efectes neurotòxics induïts pel tractament amb A β 1-42, vam investigar l'efecte de la sobreexpressió de NP1 produïda per la transducció del transgen de NP1 mediada per lentivirus. Vam tractar els cultius de cèl·lules corticals amb els vectors lentivirals bicistrònics pWPI-NP1, per tal d'induir la sobreexpressió de NP1 i GFP, i pWPI-GFP, com a vector control. Uns 6 dies després de la transducció dels cultius de neurones corticals amb aquests vectors, s'observa expressió de GFP en el 80-90% de les cèl·lules (Figura 42).

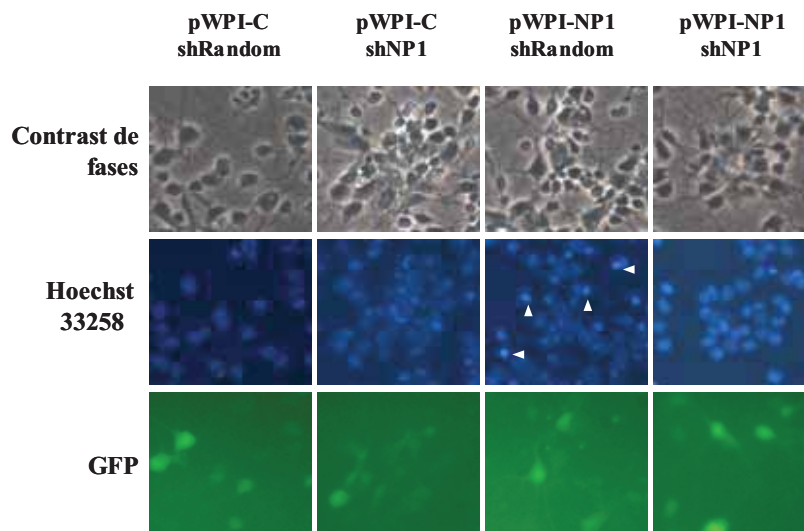


Figura 42. Imatges de contrast de fases, de fluorescència de GFP i de fluorescència de tinció Hoechst 33258 de neurones corticals transduïdes amb els quatre vectors lentivirals (*pWPI-C*, *pWPI-NP1*, *pLVTHM-shRandom* i *pLVTHM-shNP1*).

Vam analitzar els nivells de proteïna per *western blot* després de la transducció de les neurones corticals amb *pWPI-NP1* i vam veure que hi ha un increment de l'expressió de NP1 que no s'observa amb la transducció del *pWPI-C* (Figura 43).

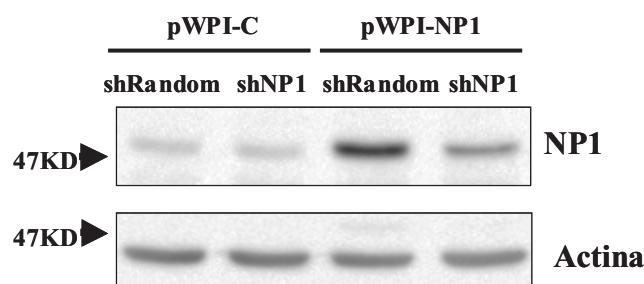


Figura 43. *Western blot* mostrant que la transducció de les neurones corticals amb el lentivirus *pWPI-NP1* induïx un increment molt significatiu dels nivells de NP1 i que el silenciament de l'expressió de NP1 mitjançant la transducció amb el lentivirus *shNP1* és capaç de reduir la sobreexpressió de NP1. La actina es va utilitzar com a control de càrrega.

Aquest increment en els nivells de NP1 es bloqueja amb la interferència d'ARN contra el missatger de la NP1 quan el pWPI-NP1 es co-transdueix amb el vector lentiviral pLVTHM-shARNi-NP1 (Figura 43).

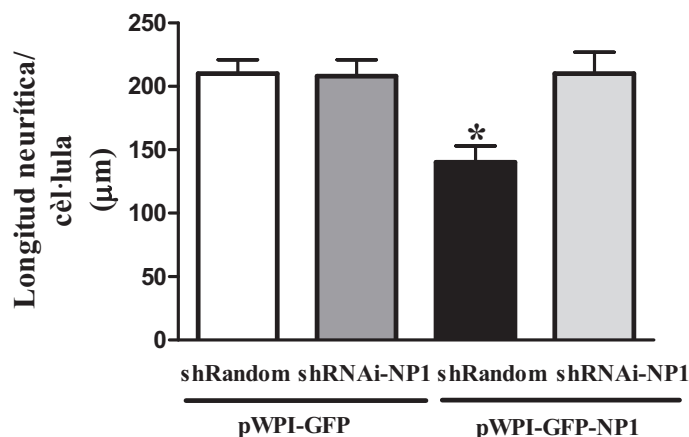


Figura 44. El comptatge de la longitud neurítica de les neurones corticals transduïdes amb els quatre lentivirus es va fer mitjançant el procediment estereològic a 4DIV. Els resultats mostren la reducció de la llargària neurítica en les cèl·lules que sobreexpressen NP1. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

L'increment de NP1 induït per pWPI-NP1 provoca una reducció d'un 33% de la llargària de les neurites en les neurones corticals. En les neurones transduïdes amb els vectors control vam observar una llargària mitja de $210 \pm 11 \mu\text{m}$ mentre que en les neurones que sobreexpressaven NP1 presentaven una llargària mitja de $140 \pm 13 \mu\text{m}$ (Figura 44). A més de la reducció de la llargària de les neurites, la sobreexpressió de NP1 també indueix un increment molt significatiu del nombre de nuclis apoptòtics. En els tractaments control observàvem l'aparició d'un $8 \pm 1\%$ de nuclis apoptòtics mentre que en els cultius que sobreexpressaven NP1 hi havia un $23 \pm 4\%$ (Figura 45).

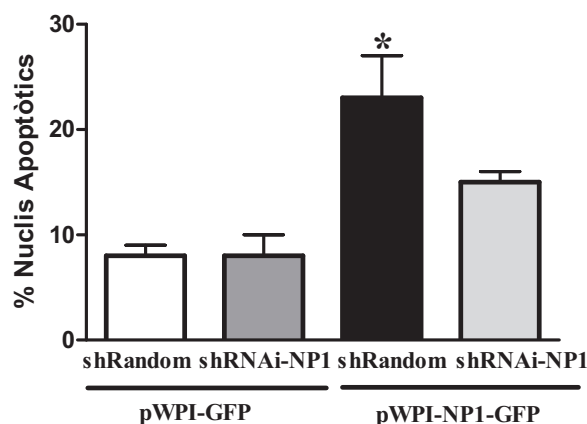


Figura 45. Es va fer tinció Hoechst 33258 a DIV6 de les neurones corticals transduïdes amb els quatre lentivirus i es va fer comptatge de nuclis apoptòtics. Els resultats mostren l'increment de nuclis apoptòtics induïts per la sobreexpressió de NP1. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

Aquests dos efectes neurotòxics induïts per la sobreexpressió de NP1, tant la reducció de la llargària dels processos neurítics com l'increment en l'aparició de nuclis apoptòtics, es bloquejen quan l'expressió de NP1 es silenciada amb el vector lentiviral pLVTHM-shARNi-NP1 (Figura 44 i 45).

7.- ANÀLISI DELS NIVELLS DE NP1 EN HOMOGENATS DE CERVELLS HUMANS

Per tal de veure si els resultats observats *in vitro* es reproduïen *in vivo* vam estudiar els nivells de NP1 en cervells de malalts d'Alzheimer respecte cervells control. Vàrem fer una extracció de proteïnes a partir d'aquests teixits i vam analitzar les mostres per *Western Blot*. Tal i com s'observa en la figura 46 l'anticòs utilitzat contra NP1 reconeix una banda d'aproximadament 54KDa en els homogenats de cervells control i de cervells procedents de malalts d'Alzheimer. La intensitat de la banda de NP1 reconeguda per aquest anticòs és molt més gran en les mostres procedents de cervells d'Alzheimer comparada amb les mostres control.

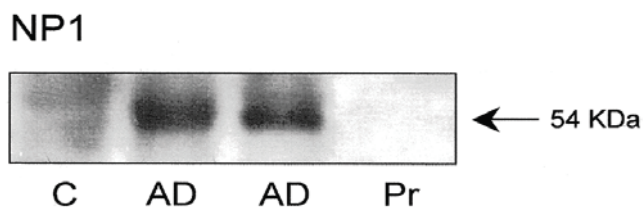


Figura 46. Western blot representatiu d'homogenat d'hipocamp mostrant l'increment d'expressió de NP1 en els cervells de malalts d'Alzheimer (AD) respecte el cervell control (C). La banda corresponent a la NP1 desapareix després de la preabsorció amb la proteïna recombinant GST-NP1(Pr), el que demostra l'especificitat de la banda de NP1 observada.

L'especificitat de l'anticòs contra NP1 va ser confirmada pel fet de que la pre-absorció de l'anticòs mitjançant incubació amb un excés de la proteïna recombinant GST-NP1, elimina la senyal que s'obté en el *Western* (Figura 46).

8.- LOCALITZACIÓ DE LA IMMUNOREACTIVITAT DE NP1 EN CERVELLS DE MALALTS D'ALZHEIMER I DE RATOLINS TRANSGÈNICS APP/PS1

Es van fer assaigs d'immunohistoquímica per analitzar la distribució de NP1 en el cervell i vam observar que la immunoreactivitat de NP1 a l'hipocamp i al còrtex entorrinal dels cervells control es restringeix al neuropil, que és la xarxa complexa i ordenada formada per les prolongacions neuronals, tant dendrítiques com axòniques, i glials. Vam veure que la capa plexiforme interna de l'àrea CA3 de l'hipocamp i l'*hilus* del gir dentat eren particularment riques en dipòsits immunoreactius de NP1. La preabsorció de l'anticòs amb la proteïna recombinant GST-NP1 va eliminar completament la senyal. En teixit procedent de malalts d'Alzheimer la immunoreactivitat de NP1 es trobava al component neurític de les plaques senils mentre que en el centre de la placa amiloidea no s'observava marcatge (Figura 47A i 47B). Aquesta immunoreactivitat va resultar ser específica ja que no es va observar marcatge quan les seccions van ser incubades amb l'anticòs pre-absorbit amb la GST-NP1 (Figura 47C).

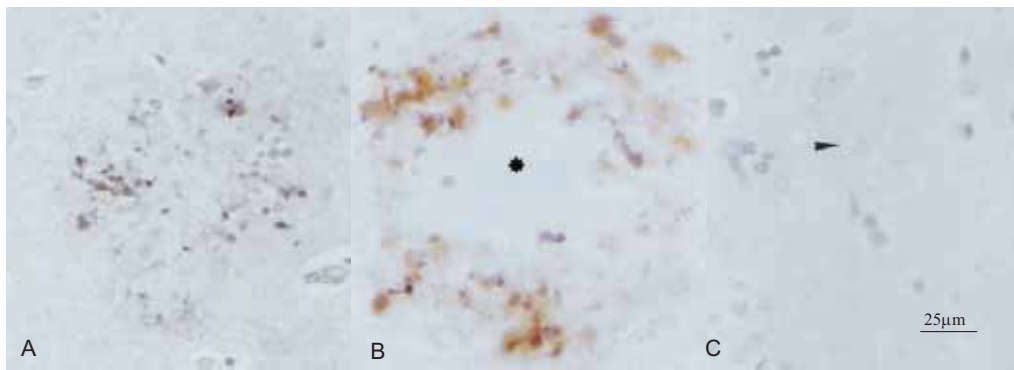


Figura 47. Imatges corresponents a la immunohistoquímica de NP1 en seccions de teixit de cervell de malalts d'Alzheimer. A i B) La immunoreactivitat de NP1 es localitza a les neurites que es troben al voltant de la placa d'amiloid (asterisc). C) La immunoreactivitat de NP1 desapareix després de la preabsorció amb la proteïna recombinant GST-NP1.

Quan vàrem realitzar assaigs de doble-immunohistoquímica per NP1 i fosfo-tau (amb l'anticòs AT8), vam veure que NP1 co-localitza amb els dipòsits de tau de les neurites distròfiques que es troben a les plaques neurítiques (Figura 48A i 48B). A més, vam veure que les neurones amb cabdells neurofibril·lars no són reconegudes per l'anticòs contra NP1, així l'increment en la immunoreactivitat de NP1 que veiem en el soma de les neurones en els cervells d'Alzheimer no està associada amb els dipòsits intracel·lulars de tau fosforilada (Figura 48A i 48B).

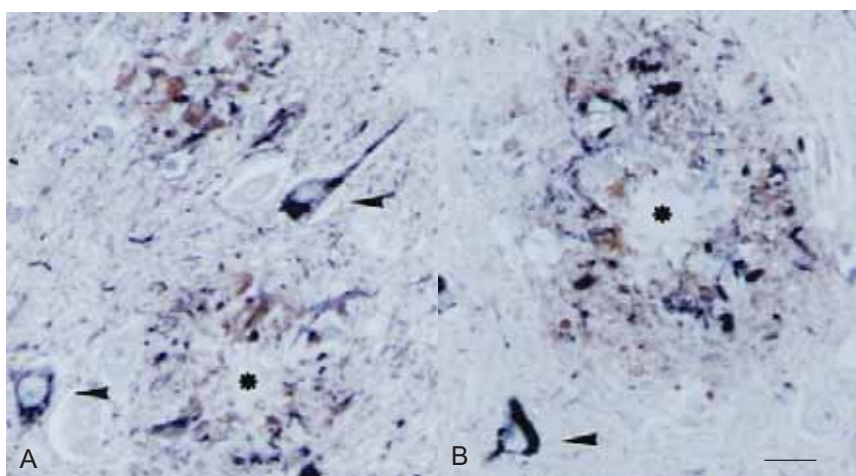


Figura 48. Imatges corresponents a la immunohistoquímica doble contra NP1 (precipitat marró) i tau fosforilada (precipitat blau fosc) que mostren co-localització de

NP1 i Tau a les neurites distròfiques de les plaques senils, però no en les neurones amb cabdells neurofibril·lars (fletxes). Barra de l'escala: 50µm.

En assaigs d'immunofluorescència doble i microscopia confocal vam confirmar que l'expressió de NP1 es localitza al voltant dels dipòsits d'Aβ de les plaques senils en talls de cervells de malalts d'Alzheimer (Figura 49).

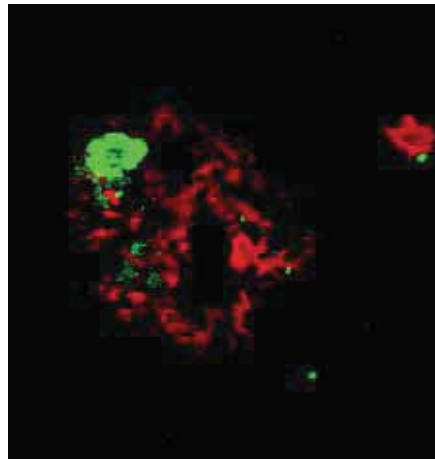


Figura 49. Anàlisi per microscòpia confocal d'una immunofluorescència contra NP1 (verd) i Aβ (vermell) d'una placa senil. S'observa que NP1 es troba a prop dels dipòsits d'amiloid de la placa senil.

També vam fer immunohistoquímica en seccions del cervell de ratolins transgènics que sobreexpressen la proteïna precursora amiloidea mutant i també la Presenilina1 (APP/PS1) (Figura 50). Primer vam fer immunohistoquímica del teixit d'aquests ratolins utilitzant l'anticòs contra Aβ i vam veure que presenten gran nombre de plaques d'Aβ en el còrtex i l'hipocamp (Figura 50A). Seccions consecutives marcades amb l'anticòs anti-tau fosforilada van mostrar la presència de petits dipòsits de la proteïna tau fosforilada al voltant de les plaques d'Aβ (Figura 50B). Utilitzant l'anticòs contra NP1 vam veure un marcatge amb un patró molt similar, ja que també vam observar immunoreactivitat puntejada associada als dipòsits d'Aβ (Figura 50C).

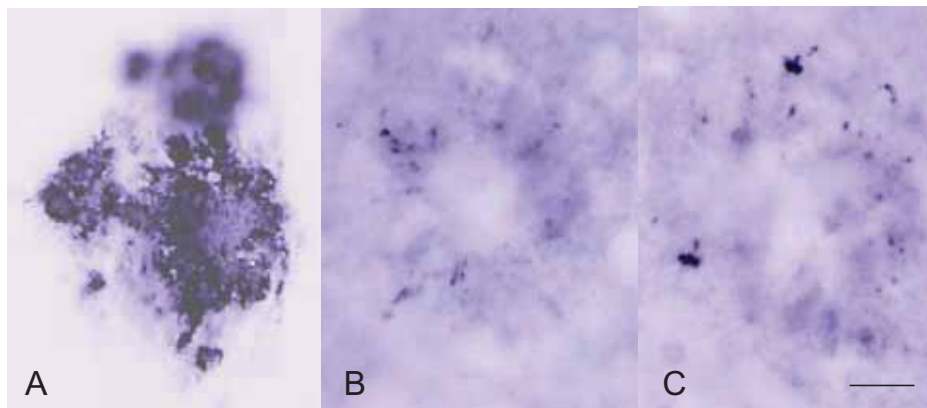


Figura 50. Immunohistoquímica contra NP1 i tau fosforilada dels dipòsits d'amiloid en els ratolins transgènics APP/PS1. A) Placa d'amiloid. B) Immunoreactivitat de tau fosforilada incrementada en les neurites distròfiques del voltant de les plaques d'amiloid. C) La immunoreactivitat de NP1 té una localització similar a la de tau fosforilada, es troba associada a les plaques d'amiloid dels ratolins transgènics APP/PS1. Barra de l'escala: 25µm.

En estudis previs del grup d'Isidre Ferrer s'ha vist que la proteïna sinàptica SNAP-25 (*synaptosomal-associated protein of 25kDa*) es troba altament expressada en les neurites distròfiques en cervells d'Alzheimer (Ferrer et al., 1998). Per tal d'acabar d'assegurar la localització de NP1 en les neurites distròfiques i la seva relació amb estructures sinàptiques, vam fer doble immunofluorescència contra NP1 i SNAP-25 i anàlisi per microscòpia confocal en seccions de cervells d'Alzheimer. Els resultats mostren que NP1 i SNAP-25 co-localitzen en la majoria de neurites distròfiques que es troben al voltant dels dipòsits d'A β que hi ha a les plaques senils (Figura 51).

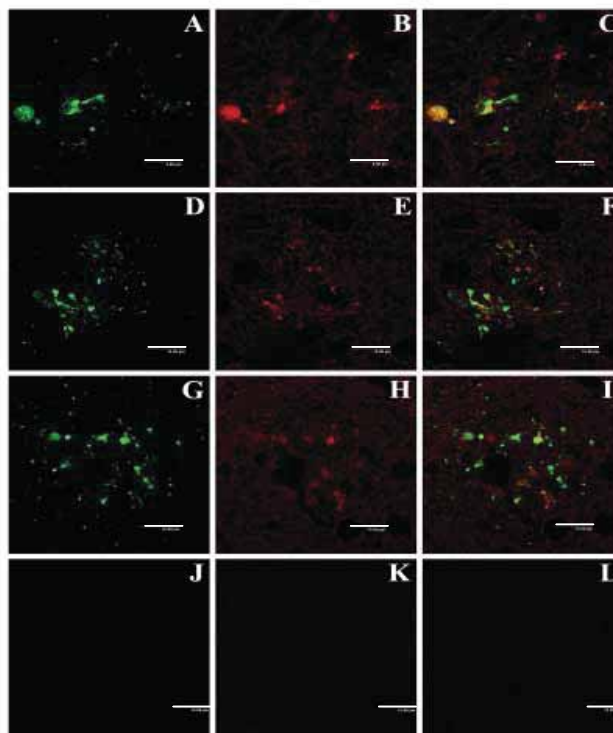


Figura 51. Immunofluorescència doble contra NP1 (verd) i SNAP-25 (vermell) de tres plaques senils diferents on es mostra co-localització (groc) de NP1 i SNAP-25 en la majoria de neurites distròfiques que es troben al voltant de la placa d'amiloid en cervells de malalts d'Alzheimer. A-C) Barra de l'escala: 8 μ m. D-L) Barra de l'escala: 16 μ m. J-L) Controls sense els anticossos primaris.

9.- EL SILENCIAMENT DE NP1 INCREMENTA EL NOMBRE DE SINAPSIS EN LES NEURONES CORTICALS

Un cop vam veure que la NP1 és necessària pels efectes neurotòxics d'A β , pel que fa a la pèrdua sinàptica, el dany neurític i la mort cel·lular, vàrem decidir seguir els nostres estudis amb l'objectiu principal d'esbrinar el paper del silenciament de la NP1 sobre la funció sinàptica.

Des d'un primer moment el grup de Perin i col·laboradors ja van hipotetitzar que la NP1 podria estar implicada en la formació i remodelació sinàptica (Schlimgen et al., 1995);(Kirkpatrick et al., 2000). Més tard, el grup de Worley va descriure que la NP1 i

la NP2 regulen l'agrupació dels receptors AMPA a la sinapsi (Xu et al., 2003), tot i que a partir d'aquests estudis no queda clar com duen a terme aquesta funció i encara faltarien estudis per determinar quin és el paper de les pentraxines a la sinapsi.

Per tal d'esbrinar la funció de la NP1 a la sinapsi vam decidir començar estudiant els efectes del silenciament de NP1 en les neurones corticals sobre els nivells de sinaptofisina, proteïna que forma part de les vesícules sinàptiques i que per tant es troba al compartiment pre-sinàptic, i sobre els nivells de PSD95, proteïna de la densitat postsinàptica.

Tal i com mostra la figura 52, el silenciament de NP1 causa un increment de l'expressió tant de sinaptofisina com de PSD95. Aquest efecte es redueix quan fem la doble transducció amb el lentivirus de silenciament i el de sobreexpressió.

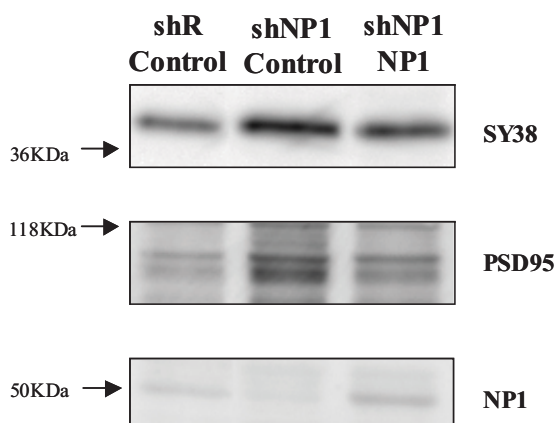


Figura 52. Western blot representatiu dels nostres resultats mostrant l'efecte del silenciament de la NP1 i de la doble transducció (shNP1-NP1) sobre els nivells de sinaptofisina (SY38) i PSD95 en neurones corticals infectades a DIV0 i extretes amb tampó de mostra a DIV8. També vàrem fer la detecció amb l'anticòs contra NP1 per veure que el silenciament i la doble transducció havien funcionat.

L'increment de l'expressió de sinaptofisina i PSD95 induïda pel silenciament de NP1 és d'un $327 \pm 34\%$ i 300 ± 50 respectivament en comparació amb els nivells control (Figura 53A i 53B). El tractament amb la doble transducció lentiviral shARNi-NP1/pWPI-NP1 induïx una reducció significativa dels nivells de sinaptofisina i de PSD95 incrementats

pel silenciament de NP1, que arriben a un $223\pm 47\%$ i 158 ± 54 respectivament (Figura 53A i 53B).

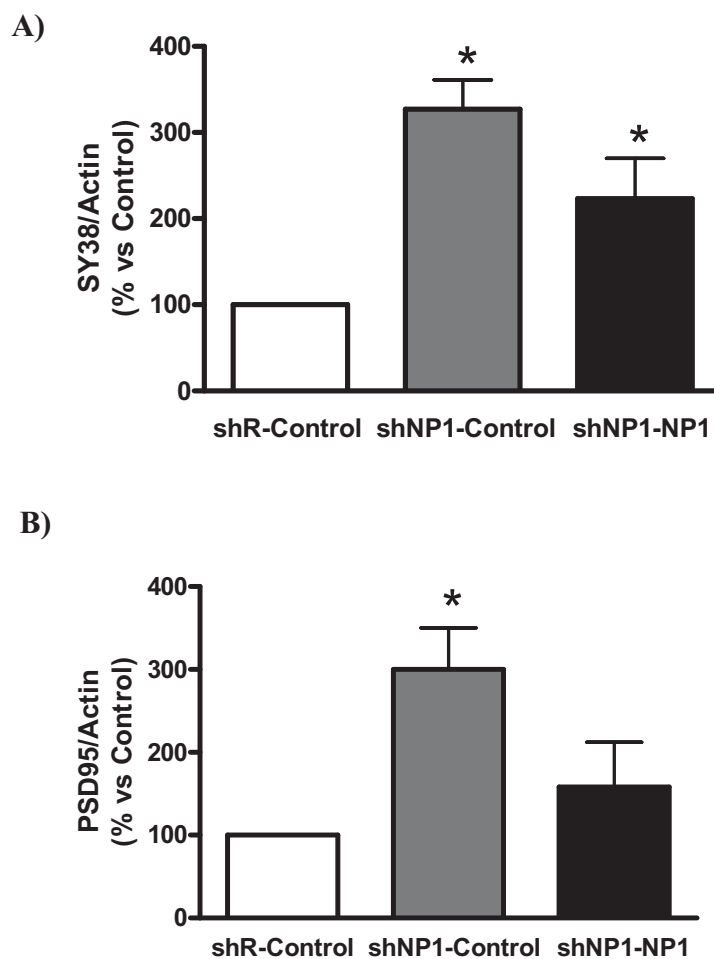


Figura 53. Gràfiques corresponents a la quantificació dels resultats obtinguts de l'efecte del silenciament de la NP1 i la doble transducció lentiviral amb l'*shARNi-NP1/pWPI-NP1* sobre els nivells de sinaptofisina (SY38) (A) i de PSD95 (B). Els valors densitomètrics de les bandes de sinaptofisina i PSD95 es van normalitzar amb els valors de les bandes d'actina corresponents. * $p < 0.05$, significativament diferent del tractament control.

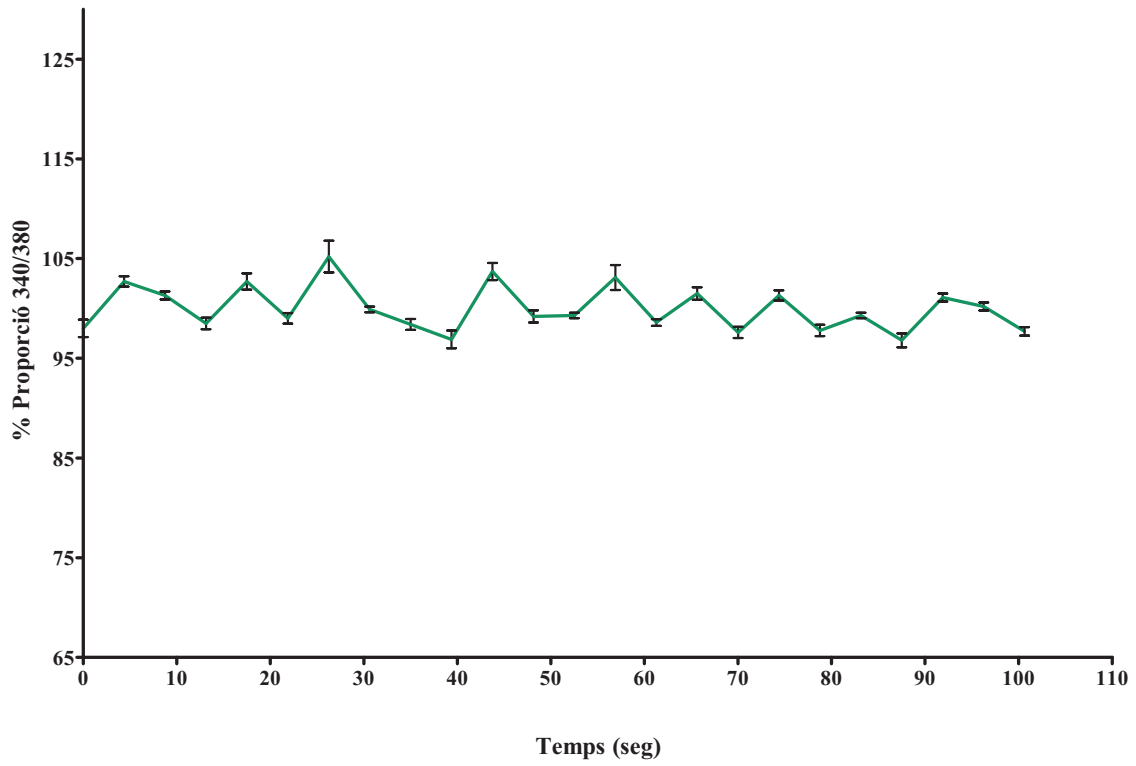
Aquests resultats indiquen que el silenciament de la NP1 està induint un increment del nombre de sinapsis ja que provoca l'increment d'expressió tant d'una proteïna presinàptica com d'una postsinàptica.

10.- LES NEURONES CORTICALS AMB LA NP1 SILENCIADA SÓN MÉS EXCITABLES

Per tal de veure si aquest increment en el nombre de sinapsis que observem amb el silenciament de la NP1 correlaciona amb un increment de l'excitabilitat neuronal vàrem decidir realitzar experiments adreçats a detectar els nivells de calci intracel·lular. D'aquesta manera un cop les neurones estaven madures, vàrem incubar les cèl·lules corticals transduïdes a DIV0 amb el lentivirus control de silenciament (shARNi-Random) i les transduïdes amb el lentivirus de silenciament de NP1 (shARNi-NP1) amb Fura-2 (Molecular Probes, Invitrogen) 5µg/ml durant 1h i les vam analitzar en un microscopi de fluorescència i el programa *Aquacosmos*. El mètode consisteix en realitzar al llarg del temps adquisicions de la fluorescència a dues longituds d'ona d'emissió diferents: 340nm (quan el Fura-2 està unit a Calci) i 380nm (quan el Fura-2 està lliure). D'aquesta manera, fent la proporció entre els valors obtinguts del registre de les dues longituds d'ona (340/380) es pot saber la quantitat de calci que hi ha dins la cèl·lula al llarg del temps.

Seguint aquest procediment vàrem veure que les neurones corticals presenten oscil·lacions de calci espontànies i sincronitzades en condicions basals, fet que estaria d'acord amb els resultats obtinguts prèviament pel grup de Tanaka i col·laboradors (Tanaka et al., 1996) (Figura 54A). A més, vam observar que les oscil·lacions sincronitzades de calci observades en les neurones amb la NP1 silenciada presentaven una major amplitud que les oscil·lacions observades en les neurones control (Figura 54A i 54B). Per tal de veure si aquests oscil·lacions de calci que es troben incrementades en les cèl·lules tractades amb l'shARNi-NP1 depenen de transmissió sinàptica vàrem tractar les neurones amb NP1 silenciada amb tetradoxina (TTX) 5µM i vam observar que efectivament les oscil·lacions es bloquejaven completament (Figura 54B). Aquest fet indica clarament que les neurones en que s'ha silenciat l'expressió de NP1 presenten unes oscil·lacions majors de calci que són bloquejades al inhibir la transmissió sinàptica i que per tant aquestes neurones són més excitable.

A)



B)

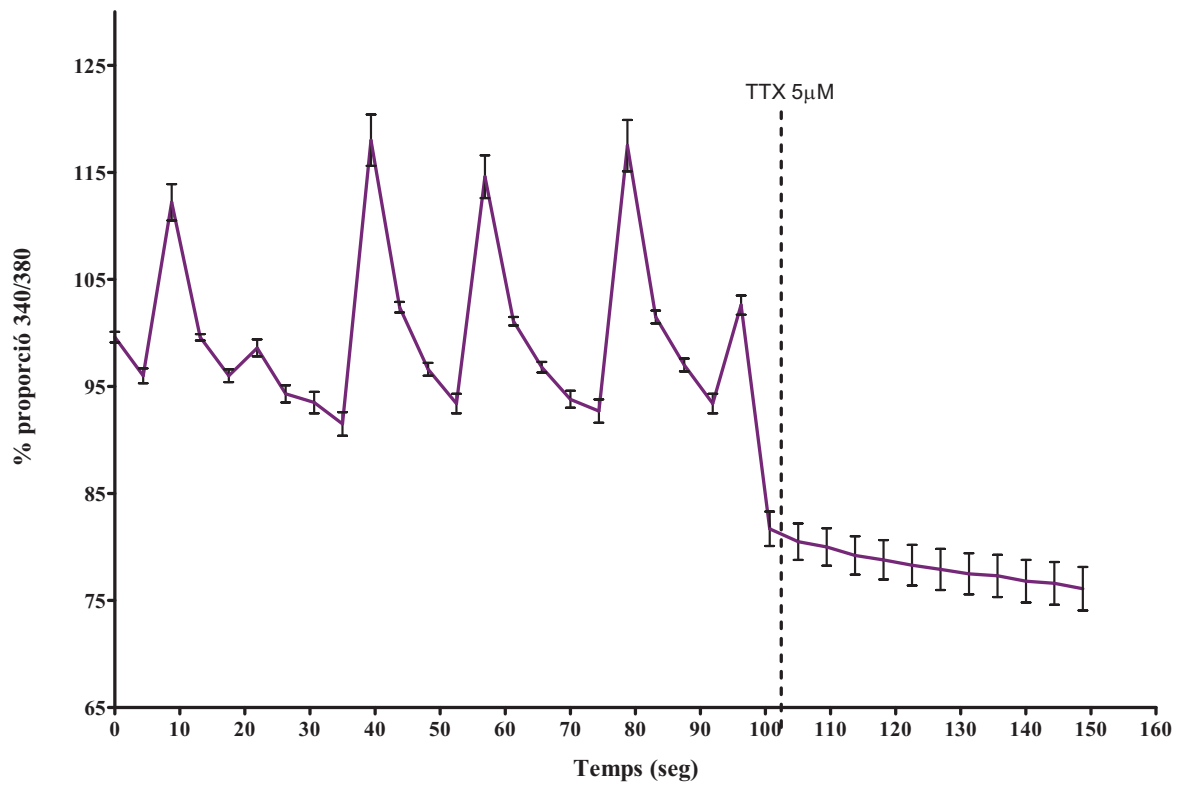


Figura 54. Gràfiques corresponents a les oscil·lacions de calci intracel·lulars observades en les cèl·lules tractades amb el lentivirus control de silenciament (A) i les tractades amb el lentivirus de silenciament de NP1 (B). A més, per veure si les oscil·lacions de calci depenien de transmissió sinàptica les neurones amb NP1 silenciada es van tractar amb tetrodotoxina (TTX) 5µM (B). Els valors estan representats en percentatge respecte la proporció de fluorescència del Fura-2 a les longituds d'ona de 340nm i 380nm.

Aquestes dades encara són preliminars i es requereixen més estudis per acabar de precisar el paper de la NP1 en la maquinària sinàptica. Aquests resultats han constituït la base d'una de les actuals línies d'investigació del laboratori que va dirigida a esbrinar aquesta nova funció de la NP1 a la sinapsi de les neurones i la relació que aquesta pugui tenir amb el paper de la NP1 en la mort neuronal.

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori han demostrat que la sobreexpressió de NP1 forma part del programa de mort que s'activa per reducció d'activitat neuronal en cèl·lules granulars de cerebel madures (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). D'altra banda s'ha vist que la mort neuronal induïda per A β en cultius de cèl·lules hipocampals és revertida quan es tracten les neurones amb inhibidors de la síntesi d'ARN i de proteïnes, el que indicaria que, tal com passa amb la privació de potassi en les cèl·lules granulars de cerebel (D'mello et al., 1993), el programa de mort activat per A β depèn de l'expressió *de novo* de gens (Takashima et al., 1993). En la mateixa línia, s'ha demostrat que els patrons d'expressió associats al programa de mort activat per A β són comparables amb els observats després de la privació de factor tròfic (Estus et al., 1997). Recentment el grup de Malinow i col·laboradors va mostrar que el pèptid A β indueix de manera selectiva una depressió de la transmissió sinàptica excitadora (Kamenetz et al., 2003).

Totes aquestes dades ens van portar a formular la hipòtesi de que la neurotoxicitat induïda per A β compartiria un mecanisme comú amb la degeneració apoptòtica induïda per la reducció d'activitat neuronal. Així, ens vàrem preguntar si la NP1 forma part dels mecanismes activats per la neurotoxicitat d'A β .

Els objectius d'aquest treball van ser investigar l'efecte dels oligòmers d'A β sobre l'expressió de NP1 en cultius primaris de neurones corticals, en cervells de pacients diagnosticats amb la malaltia d'Alzheimer i cervells d'un model animal de malaltia d'Alzheimer, partint de la hipòtesi de que si l'A β indueix una reducció de l'activitat neuronal, igual que succeeix en les cèl·lules granulars privades de potassi, s'hauria d'observar un increment en l'expressió de NP1.

1.- MALALTIA D'ALZHEIMER I OLIGÒMERS D'A β

Existeixen diferents evidències que indiquen que l'acumulació d'A β , i en particular l'acumulació dels oligòmers solubles d'A β 1-42, és la principal responsable de la neurodegeneració progressiva observada en la malaltia d'Alzheimer, que comença amb la pèrdua de contactes sinàptics associada amb l'inici del deteriorament cognitiu,

continua amb el dany neurític i finalment desemboca en la pèrdua selectiva de diverses poblacions neuronals [(Klein, 2002);(Walsh and Selkoe, 2004)].

Es pot considerar que la seqüenciació del pèptid A β al 1984, per part del grup de Glenner i Wong, va donar lloc als primers fonaments de la 'hipòtesi amiloidea' de la malaltia d'Alzheimer (Glenner and Wong, 1984). Aquesta hipòtesi proposa que l'acumulació d'A β és la responsable de la patologia relacionada amb la malaltia d'Alzheimer, incloent els dipòsits d'A β , els cabdells neurofibril·lars, la pèrdua de sinapsi i la consegüent mort cel·lular [Revisat a (Tanzi and Bertram, 2005)].

Des de ja fa temps se sap que el nombre de plaques d'amiloid en cervell no correlaciona amb la severitat de la demència, de fet aquest era un dels punts més criticats de la hipòtesi amiloidea. Estudis recents, però, han mostrat una forta correlació entre la quantitat d'oligòmers solubles d'A β i el grau de severitat de les alteracions cognitives i el dany sinàptic [(Lue et al., 1999);(McLean et al., 1999)]. A partir d'aquest moment, s'han publicat molts estudis que demostren que els oligòmers d'A β són potents neurotoxines i que són més nocives que els agregats fibril·lars d'A β [(Roher et al., 1996);(Lambert et al., 1998);(Dahlgren et al., 2002);(111)]. Per aquestes raons vam decidir realitzar els nostres experiments amb els oligòmers solubles d'A β sintètic. Per altra banda, els mecanismes moleculars que són els responsables dels efectes neurotòxics d'A β romanen desconeguts. La nostra hipòtesi es que aquests mecanismes són similars als del programa intrínsec de mort neuronal apoptòtica.

2.- LA REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE NP1 CONTRIBUEIX A LA NEUROTOXICITAT INDUÏDA PER A β

Primer de tot vam voler confirmar que, tal com havien descrit anteriorment altres grups en diferents tipus cel·lulars i cultius organotípics [(Roher et al., 1996);(Lambert et al., 1998);(Hartley et al., 1999);(Dahlgren et al., 2002)], els oligòmers solubles d'A β són potents neurotoxines. Efectivament, vam veure que l'A β 1-42 oligomèric induïx una reducció de la viabilitat neuronal de manera temps- i concentració-depenent en els cultius de corticals i que a la baixa concentració de 100nM ja s'observa un increment significatiu del nombre de nuclis apoptòtics. Aquesta neurotoxicitat no es va observar

fins a les 48h després de l'inici del tractament, i quan es va analitzar el curs temporal de concentracions més elevades, 10 μ M, la viabilitat de les cèl·lules corticals es va veure afectada a partir de les 24h de tractament. També vam veure que el tractament amb l'A β soluble indueix un increment molt significatiu dels nivells de NP1 a les 18h, entre dues i tres vegades respecte els nivells basals. Aquest increment de NP1 s'observa en un curs temporal que és anterior a l'aparició de les característiques morfològiques i bioquímiques de l'apoptosi, indicant que la regulació de l'expressió de NP1 és un esdeveniment que té lloc en les primeres etapes de la cascada neurotòxica activada per A β .

A la vegada, l'exposició de les neurones corticals a A β oligomèric indueix una reducció en la formació dels processos neurítics que està associada a una pèrdua de la funció sinàptica, ja que també veiem una reducció en els nivells de la proteïna pre-sinàptica sinaptofisina. A més, el silenciament de l'expressió de NP1, tant mitjançant l'ARN d'interferència com amb ODNs antisentit dirigits contra l'ARN missatger de la NP1, impedeix tant el dany sinàptic com la mort apoptòtica induïda pel tractament amb A β . Aquests resultats, junt amb el fet de que la sobreexpressió de NP1 induïda per la transducció amb els vectors lentivirals per si sola reproduïx els efectes neurotòxics d'A β , constitueixen una forta evidència de que la regulació de l'expressió de NP1 contribueix a la neurotoxicitat d'A β .

En conjunt, els nostres experiments mostren que la sobreexpressió de NP1 contribueix a la pèrdua sinàptica, el dany neurític i la subsegüent mort apoptòtica induïda per A β en cultius de neurones corticals. Aquests resultats permeten proposar un nou mecanisme que es necessari per a que succeeixi la neurotoxicitat d'A β , que inclou la sobreexpressió de NP1. La NP1 es una proteïna que ja ha estat previament implicada en la formació i remodelació sinàptica [(Schlimgen et al., 1995);(Xu et al., 2003)] i que a la vegada ha estat associada amb el programa de mort apoptòtica activat per la reducció de l'activitat neuronal en cèl·lules granulars de cerebel madures [(DeGregorio-Rocasolano et al., 2001);(Enguita et al., 2005)]. Així, els resultats obtinguts recolzen la hipòtesi inicial d'aquesta tesi de que el mecanismes de neurotoxicitat induïts per A β són similars als activats durant el programa intrínsec de mort neuronal apoptòtica.

Per tal d'esbrinar si els efectes que havíem observat *in vitro* estan efectivament relacionats amb la malaltia d'Alzheimer, vam estudiar els nivells de NP1 en cervells de pacients diagnosticats amb la malaltia. Els resultats obtinguts mostren que hi ha un increment molt marcat en els nivells de NP1 en el cervell de malalts d'Alzheimer en fase tardana. A més, hem vist que l'expressió de NP1 es restringeix a les neurites distròfiques que es troben al voltant de la placa d'amiloid i que no s'observa immunoreactivitat de NP1 al centre de la placa d'amiloid, dades que indicarien que l'acumulació d'A β desencadena un procés de dany neuronal similar a l'observat en les cèl·lules granulars de cerebel després de la de-aferenciació. A més, estudis de doble immunohistoquímica per NP1 i tau fosforilada mostren co-localització de NP1 amb els dipòsits de tau a les neurites distròfiques de les plaques neurítiques. Resultats similars es van obtenir en cervells de ratolins transgènics APP/PS1. En aquests ratolins, la immunoreactivitat de NP1 també està incrementada i s'associa a les neurites danyades que es troben al voltant de les plaques d'A β . Així mateix, la localització de NP1 en els processos cel·lulars anormals es va confirmar addicionalment en estudis d'immunofluorescència doble i microscòpia confocal que mostren que la NP1 co-localitza amb la proteïna SNAP-25 en la majoria de les neurites distròfiques que es troben al voltant dels dipòsits d'A β en les plaques senils. Prèviament, ja s'havia descrit que l'expressió de la proteïna SNAP-25 es troba reduïda en el centre de la placa d'amiloid, però és molt elevada en les neurites distròfiques que envolten els dipòsits d'A β (Ferrer et al., 1998).

La troballa de que aquest increment en la immunoreactivitat de NP1 està associada a les neurites distròfiques tant en cervells de malalts d'Alzheimer com en cervells d'un model animal transgènic de la malaltia d'Alzheimer, proporciona evidència neuropatològica addicional en suport de la hipòtesi que la NP1 juga un paper clau en la neurodegeneració característica de la malaltia d'Alzheimer.

3.- PRINCIPALS HIPÒTESI SOBRE ELS EFECTES DELS OLIGÒMERS D' A β

En el 2003, el grup de Malinow va descriure un model de retroalimentació negativa on proposa que la funció fisiològica d'A β es la de reduir l'activitat sinàptica. En Malinow proposa una interacció entre l'activitat neuronal i el processat de l'APP, de tal manera

que una elevada activitat neuronal donaria lloc a més producció d'A β , que a la vegada reduiria la funció sinàptica i, com a resultat, l'activitat neuronal (Figura 55A). Així, la hipòtesi de Malinow planteja que, en condicions normals, la regulació de la producció d'A β endogen dependent d'activitat està determinada per un sistema de retroalimentació negativa que manté així la hiperactivitat neuronal sota control (Kamenetz et al., 2003). Els resultats del grup d'en Malinow demostren que l'activitat neuronal controla el processament de l'APP per la γ -secretasa (BACE) i regula així la formació i la secreció d'A β . A la vegada, l'A β redueix de manera selectiva l'activitat sinàptica excitadora en les neurones que l'alliberen i en les neurones que es troben al seu voltant. Van veure també que aquesta depressió de l'activitat sinàptica induïda per A β depèn de l'activitat del receptor de NMDA i que també es pot revertir bloquejant l'activitat neuronal (Kamenetz et al., 2003).

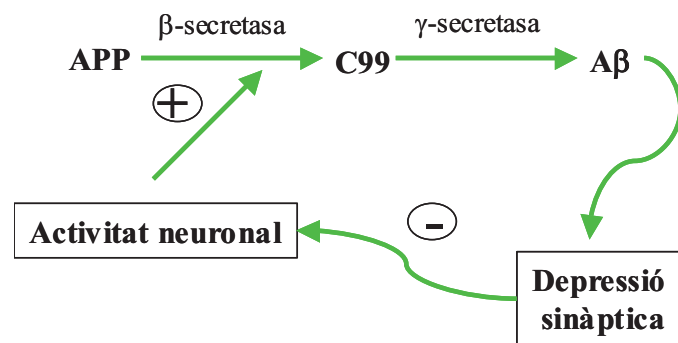


Figura 55A. Model de Malinow sobre la funció d'A β : model de retroalimentació negativa on existeix una interacció entre activitat neuronal i el processament d'APP (Kamenetz et al., 2003).

En estudis més recents del mateix grup s'han examinat els mecanismes mitjançant els quals l'A β deprimiria les sinapsi excitadores i han vist que l'A β indueix alteracions sinàptiques i estructurals a través de l'endocitosi de receptors AMPA (Hsieh et al., 2006).

En un treball de finals del 2007, Mucke i col·laboradors van presentar uns resultats que han generat certa controvèrsia amb el model proposat per Malinow. Aquest grup ha trobat que diferents línies de ratolins transgènics per APP presenten, de manera espontània, activitat epilèptica no convulsiva en les xarxes corticals i hipocampals,

indicant que l'efecte d'A β en aquestes xarxes seria excitador (Palop et al., 2007). Aquests resultats estarien d'acord amb el fet de que els malalts d'Alzheimer presenten una major incidència d'atacs epilèptics respecte una població control [(Amatniek et al., 2006);(Hauser et al., 1986)]. El grup de Mucke també ha observat que aquesta activitat epilèptica està associada amb el creixement dels processos neurítics de les neurones GABAèrgiques, amb un increment de la inhibició sinàptica i amb un dèficit en la plasticitat sinàptica del gir dentat en aquests ratolins (Palop et al., 2007). En principi doncs, aquests resultats no estan d'acord amb la hipòtesi de Malinow que indica que la funció fisiològica de A β es deprimir l'activitat sinàptica.

Però per altra banda, en ratolins transgènics que sobreexpressen APP Mucke i col·laboradors han observat alteracions en la transmissió sinàptica glutamatèrgica i en els nivells dels receptors d'NMDA i d'AMPA (Palop et al., 2007). Concretament, els ratolins presenten una reducció de la LTP, una alteració en els dobles polsos, una reducció en la fosforilació de la subunitat NR2B del receptor d'NMDA i una disminució en els nivells de les subunitats GluR1 i GluR2 del receptor d'AMPA en el gir dentat (Palop et al., 2007).

A diferència dels resultats previs del grup de Mucke, aquests resultats són consistents amb el treball del grup de Malinow i amb el de la resta de grups que suggereixen que l'A β indueix una reducció de la transmissió sinàptica glutamatèrgica i una retracció de les espines dendrítiques excitadores [(Kamenetz et al., 2003);(Walsh et al., 2002);(Shankar et al., 2007);(Hsia et al., 1999);(Hsieh et al., 2006);(Palop et al., 2005)]. El grup de Mucke interpreta aquests resultats, que podrien semblar contradictoris, explicant que l'increment aberrant de l'activitat neuronal en les xarxes del còrtex i l'hipocamp podria coexistir amb una alteració de la transmissió glutamatèrgica en aquests ratolins (Palop et al., 2007). Encara que la relació entre aquests dos fenòmens no es coneix, els autors interpreten que hi hauria diferents possibilitats que podrien explicar la coexistència d'aquests dos fenòmens. La primera possibilitat seria que la depressió de la transmissió sinàptica glutamatèrgica podria ser un mecanisme compensatori per contrarestar la sobreexcitació. La segona seria que les interneurons inhibidores són més susceptibles als efectes depressors d'A β sobre la transmissió sinàptica glutamatèrgica que les neurones excitadores principals, i la depressió de la

inhibició conduiria a un increment global de l'excitabilitat neuronal. Per últim, una tercera possibilitat seria que les regions corticals o subcorticals que controlen l'excitabilitat neuronal podrien ser especialment susceptibles a les alteracions de la transmissió sinàptica glutamatèrgica induïdes per $A\beta$, la qual cosa induiria un increment global de la excitabilitat neuronal (Palop et al., 2007).

Finalment, Mucke i col·laboradors proposen un model, alternatiu al proposat per Malinow, per explicar la disfunció que indueix l' $A\beta$. El model seria el següent: uns nivells elevats d' $A\beta$ donarien lloc a una activitat neuronal excitadora aberrant, que activaria mecanismes inhibidors compensatoris per tal de contrarestar la hiperexcitació i que tant l'activitat excitadora aberrant com els mecanismes inhibidors compensatoris contribuirien a la disfunció de la xarxa neuronal relacionada amb la malaltia d'Alzheimer (Palop et al., 2007) (Figura 55B).

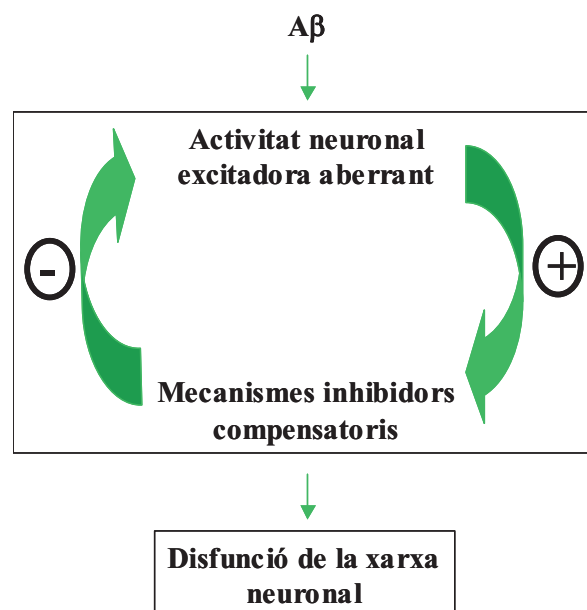


Figura 55B. Model proposat per Mucke: model de disfunció de la xarxa neuronal induïda per $A\beta$ {Palop, 2007 6416 /id}.

Els nostres resultats que demostren que els oligòmers d' $A\beta$ indueixen un increment de l'expressió de NP1 recolzarien la hipòtesi del grup de Malinow, ja que en els cultius primaris de neurones corticals tractats amb $A\beta$ observem un patró d'expressió de NP1 igual que l'observat en les cèl·lules granulars quan es redueix l'activitat neuronal

[{DeGregorio-Rocasolano, 2001 5786 /id};(Enguita et al., 2005)]. Un altre dels nostres resultats que indiquen que la NP1 està associada amb la depressió de l'activitat neuronal i que recolza la hipòtesi del grup d'en Malinow es que el silenciament de l'expressió de NP1 incrementa l'excitabilitat de les neurones corticals augmentant les oscil·lacions espontànies de la concentració de calci intracel·lular (Figura 54 de Resultats).

4.- POSSIBLES MECANISMES D'ACCIÓ DE L'A β I L'EXPRESSIÓ DE NP1

Tot i les intenses investigacions adreçades a esbrinar el mecanisme d'acció de l'A β , encara es desconeix com interacciona amb les neurones i activa la cascada bioquímica de senyalització que indueix disfunció neuronal i la neurotoxicitat. Els resultats d'aquesta tesi indiquen que la regulació de l'expressió de NP1 és part d'aquesta cascada neurotòxica que, a la vegada, comparteix mecanismes amb el procés de mort cel·lular activat per la reducció de l'activitat neuronal.

La via intracel·lular de transducció de senyals mitjançant la qual l'A β indueix el programa de neurodegeneració dependent d'expressió gènica i de la sobreexpressió de NP1 encara no ha estat caracteritzada, però diferents estudis suggereixen que un dels passos d'aquesta via és la regulació de l'activitat de GSK-3. L'exposició dels cultius primaris de neurones a A β incrementa l'activitat de GSK-3 (Takashima et al., 1998). A més, diferents laboratoris han mostrat que la inhibició de l'activitat de GSK-3 bloqueja la neurotoxicitat induïda per A β [revisat a (Bhat et al., 2004)]. En aquests estudis s'ha vist que els efectes tòxics d'A β es redueixen amb el tractament amb oligodeoxinucleòtids antisentit contra GSK-3 (Takashima et al., 1993), amb l'inhibidor de GSK-3 liti [(Alvarez et al., 1999);(Wei et al., 2000)], i també amb l'inhibidor més específic de GSK-3 AR-A014418 (Bhat et al., 2003). A més, la sobreexpressió condicional de GSK-3 en ratolins reproduïx diferents aspectes de la neuropatologia observada en la malaltia d'Alzheimer (Engel et al., 2006).

D'altra banda, els nostres estudis previs indiquen que l'activitat de GSK-3 regula l'expressió de NP1 (Enguita et al., 2005). D'aquesta manera, la reducció de l'activitat de GSK-3 mitjançant el tractament amb inhibidors farmacològics com el liti o l'SB415286, un inhibidor més específic, bloqueja la sobreexpressió de NP1 i protegeix

a les cèl·lules granulars de cerebel de la mort induïda per la reducció d'activitat neuronal [(DeGregorio-Rocasolano et al., 2001;Enguita et al., 2005)]. Aquestes diferents evidències recolzen la interpretació de que els oligomers solubles d'A β induïxen la sobreexpressió d'NP1 incrementant l'activitat de GSK-3.

5.- FUNCIO DE LA NP1

Actualment, a part de la seva implicació en el programa de mort neuronal, es desconeix quina és la funció de la NP1. Estudis de diferents laboratoris suggereixen que les pentraxines neuronals podrien tenir diferents funcions. En un primer moment es va proposar que les pentraxines neuronals participen en la formació i remodelació sinàptica [(Kirkpatrick et al., 2000);(Schlimgen et al., 1995)]. S'ha descrit que la NP1 i la NP2 també regulen l'agrupació dels receptors AMPA de glutamat a la sinapsi en un subconjunt de sinapsis excitadores (Xu et al., 2003). La implicació de la NP1 a la sinapsi es veu confirmada pels últims resultats del nostre laboratori que indiquen que el silenciament de l'expressió de la NP1 mitjançant la transducció lentiviral induïx un increment de l'expressió tant de sinaptofisina com de PSD95, increment que és revertit quan es fa la transducció doble amb els lentivirus de silenciament i de sobreexpressió de NP1. Aquests resultats indiquen que el silenciament de l'expressió de NP1 induïx un increment del nombre de sinapsi, tot i que encara falten més experiments per identificar el mecanisme molecular mitjançant el qual induïx aquest increment. A més, els resultats d'aquesta tesi que demostren que la sobreexpressió de NP1 incrementa l'aparició de neurones amb nuclis apoptòtics i amb la caspasa-3 activada proporcionen evidència addicional en suport a la hipòtesi de que la NP1 forma part del programa de mort activat per estímuls patològics en les neurones madures. La relació entre totes aquestes funcions de la NP1 i el seu paper en la mort neuronal programada encara no ha estat descrita.

En un primer moment, estudis realitzats pel grup de Worley a la Universitat Johns Hopkins van mostrar que la NP2 co-localitza amb la subunitat GluR1 del receptor d'AMPA i que induïx l'agregació de les subunitats GluR1, GluR2 i GluR3 a la sinapsi, però no del GluR4 (O'Brien et al., 1999). En un estudi posterior van comunicar que la NP1 i la NP2 es troben de manera selectiva a les sinapsi excitadores, ja que co-localitzen amb GluR2, que les dues pentraxines es troben tant al compartiment pre- com

post-sinàptic (Xu et al., 2003). Més tard junt amb el grup d'Huganir van publicar que la NP1 i el receptor de les pentraxines, NPR, són necessaris pel reclutament de la subunitat GluR4 del receptor AMPA a la sinapsi i postulen que la NP1 i el NPR serien secretats a partir del terminal pre-sinàptic i s'unirien al GluR4, reclutant-lo d'aquesta manera a la sinapsi (Sia et al., 2007). És difícil establir una funció precisa de les pentraxines a la sinapsi a partir d'aquests resultats, alguns d'ells contradictoris entre si, el que indica que encara són necessaris més estudis per tal d'esbrinar quin és el paper de la NP1, i de les pentraxines llargues en general, en les sinapsis excitadores.

A la vegada, s'ha vist que els ratolins KO per NP1 són viables, fèrtils i no mostren cap alteració evident de l'estructura del cervell, cerebel o hipocamp o canvis en el comportament (Kirkpatrick et al., 2000). La redundància funcional amb altres pentraxines o amb altres mecanismes compensatoris durant el desenvolupament neuronal podrien explicar l'absència d'un fenotip clar en aquests ratolins. Tot i així, els nostres resultats amb el silenciament de la NP1 mitjançant l'ARN d'interferència, explicats anteriorment, prediuen que els ratolins KO d'NP1 haurien de mostrar resistència als efectes neurotòxics d'A β .

La regulació de l'expressió de NP2 depèn d'activitat i es sobreexpressa quan hi ha una situació d'activitat neuronal intensa com la que succeeix durant les convulsions induïdes per electroxoc (Xu et al., 2003). Al contrari, l'expressió de NP1 incrementa ràpidament quan hi ha una reducció en l'activitat neuronal i s'indueix mort cel·lular (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001; Enguita et al., 2005). Basant-nos en aquestes observacions, vam plantejar la hipòtesi de que les pentraxines neuronals formarien part d'un interruptor gènic que regularia la supervivència o mort neuronal depenent de l'activitat sinàptica (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). Així, tant la reducció de l'activitat sinàptica per denervació, per reducció de la concentració extracel·lular de potassi o per sobreproducció d'A β poden induir la sobreexpressió de NP1. En base als resultats obtinguts en aquesta tesi, la hipòtesi planteja també, que la sobreexpressió de NP1 induïda per A β impedeix l'efecte de la NP2 en facilitar l'agrupament de receptors AMPA en sinapsis excitadores (Figura 56).

Està descrit que l'A β indueix una pèrdua de la subunitat GluR1 del receptor AMPA a la superfície (Almeida et al., 2005) i que promou l'endocitosi dels receptors d'NMDA (Snyder et al., 2005). També s'ha descrit que l'A β utilitza les vies de senyalització de la depressió a llarg termini (LTD, *long-term depression*) per induir l'endocitosi dels receptors d'AMPA que es troben a la sinapsi. La pèrdua dels receptors AMPA és necessària i suficient per tal de que es produeixi la pèrdua d'espines dendrítiques i les respostes sinàptiques d'NMDA (Hsieh et al., 2006). Aquests resultats són particularment rellevants pels nostres estudis que demostren que els efectes neurotòxics d'A β depenen de la sobreexpressió de NP1 ja que la NP1 s'ha proposat que agrega els receptors AMPA a les sinapsi excitadores (Xu et al., 2003). La NP1 comparteix amb la NP2 la habilitat per agrupar els receptors AMPA a les sinapsi excitadores i les dues proteïnes poden formar heteròmers, fet que permet que aquestes dues proteïnes formin complexos altament organitzats que agrupen els receptors AMPA a les sinapsis i que d'aquesta manera regulin la sinaptogènesi de forma dependent d'activitat [(O'Brien et al., 2002; O'Brien et al., 1999); (Xu et al., 2003); (Reti et al., 2002)].

La NP1 és menys eficient que la NP2 a l'hora d'agregar els receptors AMPA i la proporció de cada proteïna en els heterocomplexos NP1/NP2 determinaria l'eficiència de l'activitat agrupadora pel complex pentraxina (Xu et al., 2003).

Recentment s'ha descrit un efecte funcional de la reducció dels receptors d'AMPA a la sinapsi; s'ha suggerit que l'establiment de la memòria està mediat pel tràfic dels receptors AMPA i que la incorporació d'aquests receptors a la sinapsi és necessària perquè tingui lloc l'aprenentatge (Rumpel et al., 2005). Tenint en compte aquestes dades i els nostres resultats que mostren que A β incrementa l'expressió de NP1, proposem un model hipotètic per explicar la degeneració neuronal que resulta de la reducció d'activitat sinàptica. Preveiem que els elevats nivells de NP1 induïts per A β reduirien la capacitat del complex NP1/NP2 d'agrupar receptors AMPA a la sinapsi, ja que reduiria la quantitat de NP2 en els heterocomplexos (Figura 56). El resultat funcional d'aquesta alteració seria perjudicar la generació de noves sinapsi excitadores i l'establiment de nous patrons de memòria. A la vegada, la NP1 activaria el programa intrínsec d'apoptosi responsable del procés neurodegeneratiu crònic que comença amb retracció neurítica i continua amb la pèrdua del volum cel·lular i la mort cel·lular.

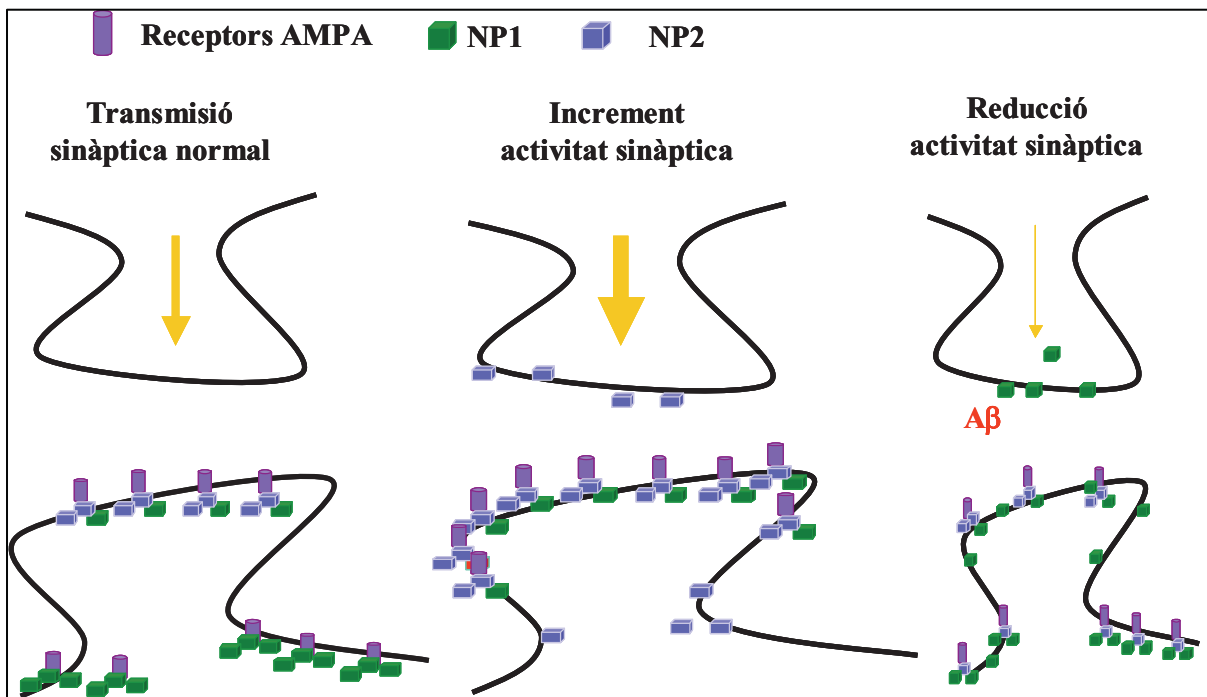


Figura 56. Les pentraxines neuronals a la sinapsi.

La hipòtesi de que la NP1 redueix l'activitat en les sinapsis excitadores es veuria recolzada pels resultats obtinguts en l'estudi dels nivells de proteïnes pre- i postsinàptiques que indiquen que després del silenciament de l'expressió de NP1 hi ha un increment de sinapsi. A més, en els experiments adreçats a estudiar la concentració de calci intracel·lular hem vist que les cèl·lules amb NP1 silenciada presenten unes majors oscil·lacions espontànies de calci respecte les cèl·lules control, el que indicaria que el silenciament de NP1 fa que les cèl·lules siguin més excitables, el que aniria en concordança amb l'increment en el nombre de sinapsi observat en aquestes condicions.

Un dels mecanismes moleculars mitjançant els quals la NP1 pot alterar la plasticitat neuronal, i que encara no hem pogut estudiar, es a través de la seva interacció amb el receptor de les pentraxines neuronals. Recentment s'ha descrit que l'NPCD (*Neuronal Pentraxin Receptor Protein with a Chromo Domain*) interacciona amb el domini catalític de la proteïna tirosina-fosfatasa PTPRO, i que aquesta interacció és necessària per tal de que hi hagi creixement neurític (Chen and Bixby, 2005).

Tot i els possibles mecanismes d'acció de la NP1 plantejats en els paràgrafs anteriors que comportarien la regulació de proteïnes sinàptiques i la unió de la NP1 amb les diferents formes de processat alternatiu del seu receptor, NPCD, no descartem l'existència d'altres mecanismes mitjançant els quals la NP1 exerciria els seus efectes sobre el creixement neurític i la mort apoptòtica. Aquest és un dels objectius dels nostres estudis actuals.

En resum, els nostres resultats indiquen que la regulació de l'expressió de NP1 juga un paper clau en els efectes neurotòxics d'A β que inclouen la pèrdua de sinapsi, el dany neurític i la mort apoptòtica. A més, que el silenciament de l'expressió de NP1 indueix un increment de sinapsi i de l'excitabilitat neuronal. Aquests resultats junt amb la troballa que l'expressió de NP1 es troba incrementada en les neurites distròfiques de cervells de malalts d'Alzheimer i de ratolins transgènics APP/PS1, suggereixen que l'A β contribueix a la patologia d'Alzheimer regulant l'expressió de NP1. Estudis futurs determinaran fins a quin punt la NP1 participa en el deteriorament cognitiu característic de la malaltia d'Alzheimer.

- 1.- Els oligòmers d'A β causen pèrdua de contactes sinàptics, dany neurític i mort neuronal apoptòtica en els cultius de neurones corticals.
- 2.- El tractament amb A β incrementa l'expressió d'NP1 abans d'induir mort neuronal.
- 3.- El silenciament de l'expressió de NP1 rescata les neurones corticals tant del dany sinàptic i neurític com de la mort apoptòtica induïda per A β .
- 4.- La sobreexpressió transgènica de NP1 reproduïx els efectes neurotòxics d'A β com són el dany neurític i la mort apoptòtica.
- 5.- Els nivells de NP1 estan incrementats en cervells de malalts d'Alzheimer.
- 6.- L'expressió de NP1 està associada a les neurites distròfiques que es troben al voltant de la placa d'amiloid en cervells de malalts d'Alzheimer i d'un model animal transgènic de la malaltia d'Alzheimer.
- 7.- El silenciament de l'expressió de NP1 incrementa el nombre de sinapsis excitadores.
- 8.- El silenciament de l'expressió de NP1 incrementa l'excitabilitat neuronal, augmentant l'amplitud de les oscil·lacions espontànies de $[Ca^{2+}]_i$.

Neuronal Pentraxin 1 Contributes to the Neuronal Damage Evoked by Amyloid- β and Is Overexpressed in Dystrophic Neurites in Alzheimer's Brain

Maria A. Abad,¹ Marta Enguita,¹ Nuria DeGregorio-Rocasolano,¹ Isidre Ferrer,² and Ramon Trullas¹

¹Neurobiology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain, and ²Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, 08097 Barcelona, Spain

Accumulation of amyloid- β ($A\beta$) is thought to play a central role in the progressive loss of synapses, the neurite damage, and the neuronal death that are characteristic in brains affected by Alzheimer's disease. However, the mechanisms through which $A\beta$ produces such neurotoxicity remain unclear. Because $A\beta$ depresses synaptic activity, we investigated whether the neurotoxicity of $A\beta$ depends on the expression of NP1, a protein involved in excitatory synapse remodeling that has recently been shown to mediate neuronal death induced by reduction in neuronal activity in mature neurons. We found that treatment of cortical neurons in culture with $A\beta$ produces a marked increase in NP1 protein that precedes apoptotic neurotoxicity. Silencing NP1 gene expression by RNA interference (short hairpin RNA for RNA interference) prevents the loss of synapses, the reduction in neurite outgrowth, and the apoptosis evoked by $A\beta$. Transgene overexpression of NP1 reproduced these neurotoxic effects of $A\beta$. Moreover, we found that NP1 was increased in dystrophic neurites of brains from patients with sporadic late-onset Alzheimer's disease. Dual immunohistochemistry for NP1 and tau showed that NP1 colocalizes with tau deposits in dystrophic neurites. Furthermore, NP1 colocalized with SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) in the majority of dystrophic neurites surrounding amyloid deposits. NP1 was also increased in cell processes surrounding amyloid plaques in the cerebral cortex and hippocampus of APP/PS1 (mutant amyloid precursor protein/presenilin 1) transgenic mice. These findings show that NP1 is a key factor for the synapse loss, the neurite damage, and the apoptotic neuronal death evoked by $A\beta$ and indicate that $A\beta$ contributes to the pathology of Alzheimer's disease by regulating NP1 expression.

Key words: neuronal pentraxin; programmed neuronal death; apoptosis; β -amyloid; neurite; neuropathology

Introduction

There is a pronounced loss of synapses in brain tissue from patients with Alzheimer's disease (AD), which is evident from the early stages of the disease (Davies et al., 1987; for review, see Selkoe, 2002). The loss of synapses and neurite damage are subsequently followed by the selective death of specific groups of neurons in the neocortex and limbic structures (Whitehouse et al., 1982). The loss of synapses strongly correlates with cognitive decline (DeKosky and Scheff, 1990). Accumulation of the amyloid- β ($A\beta$) peptide is one of the main characteristics of brains with AD. Recent studies in mouse models of AD have shown that soluble $A\beta$ oligomers interfere with synaptic function before structural synaptic damage and the ensuing neuronal

death is induced (reviewed in (Walsh and Selkoe, 2004). Nonetheless, the detailed mechanism by which $A\beta$ produces synaptic injury, leading to neurite degeneration and neuronal death, is still unknown.

The toxicity of $A\beta$ in primary neuronal cultures displays morphological and biochemical characteristics of programmed cell death (Loo et al., 1993). Indeed, neuronal death evoked by $A\beta$ in hippocampal cell cultures is prevented by inhibitors of protein and RNA synthesis (Takashima et al., 1993), indicating that $A\beta$ induces the expression of genes involved in the program of cell death. Moreover, the patterns of expression associated with this neuronal death program have been compared with those observed after the deprivation of trophic factors (Estus et al., 1997). Likewise, a reduction in neuronal activity triggers gene expression-dependent apoptosis in mature cerebellar granule neurons (D'mello et al., 1993), and, interestingly, it has been shown that $A\beta$ selectively depresses excitatory synaptic transmission (Kamenetz et al., 2003). We therefore hypothesized that the neurotoxicity induced by $A\beta$ might share a common mechanism with the apoptotic neurodegeneration induced by the reduction in neuronal activity.

We have reported previously that neuronal pentraxin 1 (NP1) is part of the apoptotic neuronal death program induced by the

Received Feb. 8, 2006; revised Oct. 25, 2006; accepted Oct. 26, 2006.

This work was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo with Fondo de Investigaciones Sanitarias Grants PI02055 and PI040376 (R.T.) and PI040184 (I.F.), by Thematic Network for Cooperative Research Grant G03/167, by Ministerio de Educación y Ciencia Grant SAF2005-1167 (R.T.), and by "Fundació La Caixa" Project NE03/49-00.

Correspondence should be addressed to Dr. Ramon Trullas, Neurobiology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Rosselló 161, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: rtonbi@iibb.csic.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0575-06.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/2612735-13\$15.00/0

reduction in neuronal activity in mature cerebellar granule cells (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). NP1 is a member of the pentraxin family of proteins named for their distinct structural organization of five identical subunits arranged noncovalently in pentameric radial symmetry (Osmand et al., 1977). Neuronal pentraxins such as NP1 and NP2, also called activity-related pentraxin (Narp), and the neuronal pentraxin receptor (NPR) are selectively expressed in the nervous system and have been suggested to be involved in synaptic functions (Hsu and Perin, 1995; Schlimgen et al., 1995; Tsui et al., 1996; Dodds et al., 1997). NP1 and NP2/Narp are predicted to be secreted proteins, and NPR has been identified as a type II transmembrane protein with no intracellular domain (Dodds et al., 1997; O'Brien et al., 1999; Kirkpatrick et al., 2000). However, recent studies have shown that NPR has a number of different cytoplasmic isoforms that are often associated with the inner side of the plasma membrane, suggesting that neuronal pentraxins also have physiological functions as intracellular proteins (Chen and Bixby, 2005a,b). In our previous studies, we found that a reduction in neuronal activity induces the overexpression of NP1 and that this increase in NP1 protein leads to apoptotic neuronal death (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001; Enguita et al., 2005). Based on the dual function of NP1 in synapse remodeling and apoptotic neurodegeneration, and because of the sequential association between the loss of synapses and delayed cell death in AD, we asked whether NP1 might be implicated in the mechanisms underlying A β neurotoxicity. Thus, we investigated the effect of oligomeric A β on NP1 expression in primary cortical cells in culture. Furthermore, we also studied the expression of NP1 in brains from patients diagnosed with AD as well as in brains from an animal model of AD.

Materials and Methods

Cell culture. Primary cultures of brain cortical neurons were essentially prepared as described previously (Morishima et al., 2001). The frontal-lateral cortical lobes were dissected out of Sprague Dawley embryonic day 18 rat fetuses, and the cells were chemically dissociated in the presence of trypsin and DNase I before plating in poly-L-lysine (100 μ g/ml)-coated 24- or 6-well plates or on coverslips. For neuronal death assays, cortical cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/cm² in basal Eagle's medium (BME) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; heat inactivated), 0.1 mg/ml gentamicin, 2 mM glutamine, 20 mM glucose, and 25 mM KCl. After 1 d in culture, the medium was changed to serum-free DMEM supplemented with B27 (Invitrogen, San Diego, CA), and the culture medium was partially replaced every 3 d with fresh DMEM supplemented with B27. Cortical cell cultures were kept at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂/95% air, and cortical neurons were used for experiments after 4–6 d *in vitro* (DIV). All procedures involving animals and their care were approved by the ethics committee of the University of Barcelona and were conducted in accordance with institutional guidelines in compliance with national (Generalitat de Catalunya) and international (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academy Press, 1996) laws and policies.

Treatment of cortical cultures with A β peptides. The A β peptide (25–35), the inactive control A β 35–25, and A β 1–42 were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). One millimolar stock solutions of A β 25–35 and A β 35–25 were prepared in sterile water and stored at –20°C. A working solution of 0.5 mM was prepared in PBS for each peptide and directly diluted in the culture medium at the required concentration. Soluble oligomers of A β 1–42, were prepared as described previously (Lambert et al., 1998; Dahlgren et al., 2002; Klein, 2002).

Determination of cell viability and apoptosis in cortical cultures. Cell viability was assessed using two different methods. In some experiments, we used propidium iodide (PI) staining, which was excluded from viable cells. Damage to the cytoplasmic membrane permits the entry of PI, which yields a bright red fluorescence after its interaction with nuclear DNA. In time course experiments, PI fluorescence was measured in 24-

well plates using a Cytofluor 2350 scanner (Millipore, Barcelona, Spain), with 530 nm (25 nm bandpass) excitation and 645 nm (40 nm bandpass) emission filters. The percentage of nonviable cells was measured using a modification of the method described by Rudolph et al. (1997) and DeGregorio-Rocasolano et al. (2001). In other experiments, the percentage of nonviable cells was measured by counting the number of PI-stained and total cells using simultaneous fluorescence and phase-contrast photomicrographs obtained with an inverted Olympus (Tokyo, Japan) IX70 fluorescence microscope. In these experiments, cortical neurons were grown in 6-well plates, incubated with 5 μ M PI for 30 min, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS containing 2% sucrose for 30 min at room temperature, and rinsed with PBS before the addition of a final glycerol protective layer.

For morphological determination of apoptosis, cortical neurons were grown in 6-well plates, and the nuclei were stained with Hoechst 33258 (Sigma, St. Louis, MO). After removing the medium, the neurons were washed with ice-cold PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS containing 2% sucrose for 30 min at room temperature, and subsequently incubated with ice-cold methanol for 2 min. The cells were then stained with Hoechst 33258 (175 ng/ml in PBS) for 10 min at room temperature and covered with glycerol. Nuclei were visualized using an Olympus IX70 inverted fluorescence microscope with a 30 \times objective. In each experiment, photomicrographs were taken by a neutral observer from three randomly chosen fields per well, and at least three wells were examined for each treatment. Graphs based on cell counts represent the mean \pm SE from three independent experiments.

Determination of neurite outgrowth. Cortical neuronal cultures were seeded at 5×10^4 cells/cm² on Biocoat 6-well plates coated with poly-D-lysine/mouse laminin (Becton Dickinson, Los Angeles, CA). Phase-contrast digital images were captured in live cortical neurons with an Olympus IX70 inverted fluorescence microscope with a 30 \times objective using the image analysis program AnalySIS (Soft Imaging System, Lakewood, CO). The length of neurites was determined using a stereological procedure (Ronn et al., 2000). The total neurite length per cell was estimated by counting the number of intersections made by neurites on 10 test lines in an unbiased counting frame superimposed on digital images of cell cultures. The absolute neurite length (L) was estimated per cell from the number of neurite intersections (I) per cell by applying the equation $L = (\pi d/2)I$ to describe the relationship between the number of neurite intersections and the vertical distance (d; 20 μ m), between the 10 test lines used (Ronn et al., 2000).

Immunocytochemistry of primary cortical neuron cultures. Cortical neurons were plated in Permanox Lab-Tek Chamber slides (NalgeNunc) coated with poly-L-lysine (100 μ g/ml) at a density of 5×10^4 cell/cm² for neurite outgrowth and 2×10^5 cell/cm² for cleaved caspase 3 immunocytochemistry. Neurons were fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde in PBS containing 2% sucrose, permeabilized in 0.2% Triton X-100 for 5 min at room temperature, and rinsed in PBS. The coverslips were preincubated with blocking solution [10% normal goat serum and 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS] for 1 h and exposed to the primary antibodies diluted in 1% BSA/PBS overnight at 4°C. The antibodies used were as follows: mouse anti- α -tyrosinated-tubulin (1:800; Sigma); rabbit anti-human cleaved caspase-3 (1:100; Cell Signaling Technology, Beverly, MA); mouse anti-microtubule-associated protein 2 [MAP2 (2a + 2b)] (1:250; Sigma); rabbit anti-synapsin 1 (1:500; Sigma); Alexa Fluor 568-conjugated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG (1:1000; Invitrogen, Eugene, OR); Alexa Fluor 568-conjugated F(ab')₂ goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen).

Lentiviral vectors. The self-inactivating bicistronic lentiviral transfer vector constructs pWPI and pLVTHM, as well as the second-generation lentivirus packaging and envelope plasmids, were kindly provided by Dr. D. Trono (Lausanne, Switzerland) (Wiznerowicz and Trono, 2003, 2005; Zufferey et al., 1998). The pWPI lentiviral vector carries the EF1 α promoter and a 5' to 3' central polyurine tract, an expression cassette, the cephalomyocarditis virus internal ribosome entry site (IRES), and green fluorescent protein (GFP) encoded downstream of the IRES, as well as the post-transcriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus to enhance gene expression. In addition, the pLVTHM vector carries the H1 RNA polymerase III promoter to permit the expression of

a short hairpin RNA for RNA interference (shRNAi) (Wiznerowicz and Trono, 2003). The map and the sequences of these plasmids are available at <http://tronolab.epfl.ch/page58115.html>. The coding sequence for NP1 was cloned from rat brain cDNA (Quick Clone cDNA; Invitrogen) by PCR. The pWPI-NP1-GFP vector was obtained by inserting the NP1 cDNA, containing the Kozak consensus sequence ACC before the initiation codon, by blunt end ligation into pWPI using the PmeI restriction sites. The vector pLVTHM-shRNAi-NP1-GFP was constructed to express short interfering RNAs to silence NP1 expression. A sequence targeting NP1 was selected based on the rules for RNAi susceptibility proposed by Tuschl's group (Elbashir et al., 2001) and using the RNAi prediction program from the Bioinformatics group of the Whitehead Institute for Biomedical Research. Two complementary DNA oligonucleotides (Roche, Berlin, Germany) were annealed to produce a double-stranded DNA fragment encoding a 19-nucleotide sense strand, 9-nucleotide loop, and 19-nucleotide antisense strand of the NP1 target or of a random sequence. The sequence of the NP1 shRNAi is as follows: 5'-gatccccGTACAGCCGCTCAATTCT tcaagagaAGAATTGAGGCG-GCTGTACTtttt-3' (sense) and 5'-agctaaaaGTACAGCCGCTCAAT-TCTtctctgaaAGAATTGAGGCGGCTGTACggg-3' (antisense). The sequence in capitals is the NP1 target sequence that corresponds to bases 1004–1022 of the NP1 mRNA (GenBank accession number U18772). We also designed an shRNAi with a random sequence to use as a control lentivector. The sequence of the shRNAi-Random is as follows: 5'-gatccccGCAGTGCAATATCGGAAACtcaagagaGTTTCCGATATT-GCACTGctttt-3' (sense) and 5'-agctaaaaGCAGTGCAATATCG-GAAACtctctgaaGTTTCCGATATTGCACTGcggg-3' (antisense). The duplex DNAs of shRNAi-NP1 and shRNAi-Random were cloned into the *Hind*III and *Bgl*II sites of the pSUPER.retro vector. After confirming the ability to silence NP1 in SH-SY5Y cells clones that permanently overexpress NP1, the H1-shRNA cassette was excised from pSUPER.retro and cloned into the lentiviral pLVTHM vector within *Eco*RI–*Clal* sites.

The viral particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G glycoprotein were produced by transient transfection in 293T cells plated in 100 mm dishes in DMEM plus 10% FBS. When subconfluent, 293T cells were cotransfected with 10 μ g of lentiviral vector containing the transgene, 7.5 μ g of the packaging plasmid psPAX2, and 3 μ g of the envelope plasmid pMD2G, using the FuGENE 6 transfection reagent (Roche). After 16 h, the medium was changed, and the virus particles were harvested 24 h later by collecting the medium. High-titer stocks (3×10^6 transduction units per microliter) were obtained by ultracentrifugation and resuspension of the viral pellet in TNE buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 130 mM NaCl, and 1 mM EDTA). Viral stocks were stored at -20°C and used within 1 month.

Transduction of cortical neurons with lentiviral vectors. Lentivirus particles were added to cortical neuron cultures immediately after plating in a volume of 10–20 μ l of viral stock. After 24 h of incubation with the lentivirus, the medium was changed to serum-free DMEM supplemented with B27 (Invitrogen). The percentage of cortical neurons expressing GFP 48 h after lentiviral transduction was 80–90%.

Oligodeoxyribonucleotide synthesis and treatment. A 21-base-long phosphorothioated antisense oligodeoxyribonucleotide (ODN) against the NP1 mRNA and its corresponding sense ODN were obtained from Roche Molecular Biochemicals (Pleasanton, CA). The sequences used were 5'-GCGTGGCGGCGCGCCGCGCCAG-3' for the NP1 antisense ODN (NP1AS) and 5'-CTGGCCGCGCGCCGCGCCAGC-3' for the corresponding sense ODN (NP1S). The phosphorothioated nucleotides are underlined. The NP1 antisense ODN sequence corresponds to nucleotides 4–24 that immediately follow the first initiation codon of the coding sequence of the NP1 cDNA. Silencing of NP1 expression in cortical neurons with ODNs was performed using LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen). An NP1S or NP1AS (0.8 μ g) LipofectAMINE complex (1:3 ratio) was prepared according to the manufacturer's instructions and added to cortical neurons after 4 DIV. The culture medium conditioned by the cells was removed and saved. The cultures were washed with BME, and 0.4 ml of transfection medium (BME without glutamine and antibiotics, at 37°C , pH 7.4) was added to the cultures. One hundred microliters of the DNA–LipofectAMINE complex mixture were added to each well, and the cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2

incubator for 4 h. The transfection medium was then removed by aspiration and replaced with conditioned medium. Experimental treatments with A β were initiated immediately afterward.

Protein expression and purification. The coding sequence for NP1 was subcloned into the *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites of the bacterial expression vector pGEX-4T-3 in frame with glutathione *S*-transferase (GST; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The fusion protein expression construct pGEX-4T-3-GST-NP1 was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) pLys S (Novagen, Madison, WI), and fusion protein production was induced by the addition of isopropyl β -thiogalactoside to a final concentration of 0.4 mM. After a 2 h induction at 37°C , the cells were harvested. Because GST-NP1 was produced as inclusion bodies, pelleted cells were resuspended in inclusion body sonication buffer (25 mM HEPES, pH 7.7, 100 mM KCl, 12.5 mM MgCl_2 , 20% glycerol, 0.1% v/v Nonidet P-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin, and 4 μ g/ml aprotinin). In this, lysis was accomplished by a combination of lysozyme treatment (incubation with 0.5 mg/ml lysozyme for 30 min), freeze–thaw cycles, and, finally, ultrasonication, and the lysate was then centrifuged at $8000 \times g$ for 10 min to pellet the inclusion bodies. Inclusion bodies were purified by washing twice with radioimmunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, and 1 mM PMSF) and solubilized in 2 vol of 10% SDS. Once the inclusion bodies were in solution, the concentration of SDS was adjusted to 1% by diluting the sample with PBS. To refold the denatured GST-NP1, the SDS concentration was further reduced to 0.01% by sequential dialysis. Finally, GST-NP1 was purified by glutathione–agarose affinity chromatography.

SDS-PAGE and Western blot analyses. Protein extracts were obtained from cell cultures at different times after treatment with A β . The protein extracts of cultures exposed to lentiviral vectors were obtained 6 d after transduction. Cortical cells were solubilized in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 2.5 mM EDTA, 75 mM DTT, and 0.01% bromophenol blue), and the homogenates were boiled for 5 min and briefly sonicated. The polypeptides were separated by 10% SDS-PAGE and electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA) according to the manufacturer's protocol. Blots were preincubated with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 before immunodetection. We used a monoclonal anti-rat NP1 antibody (1:1000; Becton Dickinson) for specific immunodetection of NP1 protein and a monoclonal antibody, clone SY 38 (1:1000; Chemicon, Ochsenshausen, Germany) for immunodetection of synaptophysin. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:10,000; Cell Signaling Technology) was used as the secondary antibody. To control for protein loaded, we used a rabbit anti-actin 20–33 antibody (1:3000; Sigma) and a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5000; Cell Signaling Technology). Immunoreactive proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence detection system (SuperSignal West Dura; Pierce, Rockford, IL), and the detection of the bands was performed using a VersaDoc Model 5000 Imaging System quantifying their intensity with the Quantity One computer software (Bio-Rad, Hercules, CA). The densitometric values of the bands representing NP1 or synaptophysin immunoreactivity were normalized to the values of the corresponding actin bands. The specificity of different NP1 antibodies was verified against recombinant NP1, NP2, and GFP proteins (supplemental Fig. 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Human brain samples. The brains of 10 patients with sporadic late-onset AD and 8 age-matched controls displaying no neurological illness were obtained at autopsy following the guidelines of the local Ethic Committee of the Hospital Universitari de Bellvitge, and after obtaining the informed consent from their relatives. The postmortem delay between death and tissue processing was between 3 and 6 h in control and diseased brains. Patients who had undergone prolonged agony were not included in this study. The AD patients were six men and four women with a mean age of 78 years, and the mean duration of the disease was 6.4 years. All of them died of natural causes at an advanced stage of the disease. Immediately after removal, coronal sections of the right cerebral and cerebellar hemispheres, and alternating 5-mm-thick sections of the brainstem, were frozen and stored at -80°C for biochemical studies. In addition,

5-mm-thick slices of the hippocampus and entorhinal cortex, as well as other brain regions, were immersed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer for 24 h, washed in PBS, and embedded in paraffin for specific immunohistochemical studies.

The neuropathological study was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of the right cerebral hemisphere, cerebellum, and brainstem. The sections were stained with hematoxylin and eosin, cresyl violet, and Klüver Barrera, and they were processed for immunohistochemistry using the avidin–biotin–peroxidase method (ABC, Vectastain; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Immunoreactivity of antibodies raised against the following was studied: phosphorylated neurofilament epitopes of 170 and 200 kDa (clones BF10 and RT97, used at dilutions of 1:100 and 1:50, respectively), phosphorylated tau (mouse anti-AT8 antibody, diluted 1:50; Innogenetics, Gent, Belgium), monoclonal A β (diluted 1:30; Sigma), and α -synuclein (diluted 1:1000; Chemicon). In the case of the sections processed for A β and α -synuclein staining, the tissue was pretreated with formic acid. Lewy bodies were not detected, and AD cases were categorized either as stages V and VI (neurofibrillary pathology) or as stage C (A β deposition) of Braak and Braak (2001).

No tau pathologies were seen in control cases, and deposits of A β were restricted to a few diffuse plaques in the inferior region of the frontal lobe and the internal region of the temporal lobe in only one case [stage A of Braak and Braak (2001)].

Western blot studies. Western blot analysis of human brain tissue was performed on frozen samples of the hippocampus obtained from the same cases. Samples were homogenized in buffer containing 100 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml leupeptin, and 5 mg/ml pepstatin (Sigma). Equal amounts of protein (10 or 20 mg) were loaded in each lane with loading buffer containing 0.125 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol, 10% mercaptoethanol, 4% SDS, and 0.002% bromophenol blue. The samples were heated at 95°C for 10 min before gel loading. The proteins were separated by gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences) using an electrophoretic transfer system (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell; Bio-Rad) at 40 mA for 1 h. Subsequently, the membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20, 5% skimmed milk, 2% BSA (Sigma), and 1% normal serum (Vector Laboratories). Pilot experiments demonstrated that the polyclonal rabbit anti-NP1 antiserum (Becton Dickinson) but not the monoclonal anti-NP1 antibody recognizes human NP1. The membranes were incubated at 4°C overnight with anti-NP1 antibody (Becton Dickinson) used at a dilution of 1:200. After washing, the membranes were incubated with anti-rabbit IgG labeled with HRP (Dako, High Wycombe, UK) diluted 1:1000 for 1 h at room temperature. The membranes were washed again and developed with the chemiluminescence ECL system (Amersham Biosciences), followed by exposure of the membranes to autoradiographic films (Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences). The protein content in each lane was evaluated by staining selected gels with Coomassie blue and membranes with Ponceau Red (Sigma). Selected membranes were immunostained with a mouse monoclonal antibody to β -actin to further control for protein loading. Control and AD cases were processed in parallel. The specificity of the polyclonal rabbit anti-NP1 antibody was confirmed by preabsorption of the antibody with the GST-NP1 recombinant protein.

NP1 single- and double-labeling immunohistochemistry. Sections were processed according to the avidin–biotin–peroxidase (ABC, Vectastain; Vector Laboratories) staining method. The sections were first boiled in citrate buffer and then stored overnight at room temperature. After blocking the endogenous peroxidase, the sections were incubated with normal serum and incubated at 4°C overnight with one of the primary antibodies. The polyclonal rabbit anti-NP1 antiserum was used at a dilution of 1:100. To test the specificity of the antibody, some sections were incubated with the rabbit anti-NP1 serum preabsorbed with the GST-NP1 recombinant protein. Other sections were incubated with only the secondary antibody. After incubation with the primary antibody, the sections were incubated for 1 h with biotinylated anti-rabbit IgG diluted 1:100, followed by ABC at a dilution of 1:100 for 1 h at room temperature.

The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide (brown precipitate). Some sections were visualized with NH₄NiSO₄ (0.05 M) in phosphate buffer (0.1 M), diaminobenzidine, NH₄Cl, and hydrogen peroxide (giving a dark blue precipitate). The tissue from control and diseased brains was processed in parallel to avoid day-to-day variations in the staining procedure. Other sections were stained with a mouse monoclonal antibody to synaptosomal-associated protein of 25 kDa (SNAP-25; Abcam, Cambridge, UK) used at a dilution of 1:1000; the immunoreaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. Sections were slightly counterstained with hematoxylin.

Dual immunohistochemistry was conducted following a two-step protocol in which the sections were first incubated with antibodies to NP1, and the immunoreaction was visualized with diaminobenzidine and hydrogen peroxide as above. Subsequently, the sections were incubated with AT8 antibody (Innogenetics) at a dilution of 1:50, and the immunocomplex was visualized with 0.01% benzidine hydrochloride, 0.025% sodium nitroferricyanide in 0.0001% M sodium phosphate buffer, pH 6.0, and 0.005% hydrogen peroxide, or alternatively with NH₄NiSO₄ (0.05 M) in phosphate buffer (0.1 M), diaminobenzidine, NH₄Cl, and hydrogen peroxide.

NP1 Immunofluorescence and confocal microscopy. Dewaxed hippocampal sections were stained with a saturated solution of Sudan black B (Merck, Darmstadt, Germany) for 30 min to block the autofluorescence of lipofuscin granules present in nerve cell bodies, rinsed in 70% ethanol, and washed in distilled water. The sections were incubated at 4°C overnight with anti-NP1 at a dilution of 1:100 and with monoclonal anti-A β at a dilution of 1:30 in a vehicle solution composed of Tris buffer, pH 7.2, containing 15 mM Na₂S₂O₃ and protein (Dako). After washing in PBS, the sections were incubated for 45 min at room temperature in the dark with the mixture of secondary antibodies diluted in the same vehicle solution as the primary antibodies. Other sections were incubated with anti-NP1 at a dilution of 1:100 and anti-SNAP-25 monoclonal antibody (Abcam) at a dilution of 1:1000. The secondary antibodies used were Alexa 488 anti-rabbit (green) and Alexa 546 (red) anti-mouse (both from Invitrogen), diluted 1:400. After washing in PBS, the sections were mounted in immuno-Fluore Mounting medium (ICN Biomedicals, Cleveland, OH), sealed, and dried overnight. The sections were examined in a Leica (Nussloch, Germany) TCS-SL confocal microscope.

Mutant amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. Mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). At the age of 12 months, the animals were perfused transcardially with saline, followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The brain was separated from the skull and immersed in the same fixative solution for 24 h. Coronal slabs were cryoprotected with 30% sucrose and frozen at –80°C. Cryostat sections (10 μ m) were obtained and processed free floating for immunohistochemistry following the ABC method as above, using antibodies against A β , NP1, and anti-tau phospho-specific Thr¹⁸¹ (Calbiochem, La Jolla, CA) at a dilution of 1:250. The immunoreactivity was visualized with NH₄NiSO₄ (0.05 M) in phosphate buffer (0.1 M), diaminobenzidine, NH₄Cl, and hydrogen peroxide. A β plaques were present in the cerebral cortex and hippocampus of transgenic mice but not in the corresponding age-matched littermates.

Statistical analysis. The results are expressed as the mean \pm SE of at least three separate experiments. The statistical significance of the differences was examined using independent *t* tests or one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* multiple comparisons using the SPSS (Chicago, IL) statistical software package when required.

Results

A β induces apoptotic neuronal death in cortical cultures

Previous studies in primary neuronal cultures have shown that the A β 25–35 peptide mimics the neurotoxic effects of the full-length A β 1–42 protein and induces the death of cortical neurons in a concentration-dependent manner (Yankner et al., 1990; Pike et al., 1995; Morishima et al., 2001). Thus, before studying the relationship between A β neurotoxicity and NP1 expression, we exposed primary cultures of rat cortical neurons to 30 μ M A β 25–

35, a concentration that induces maximal cell death in this type of neuron (Morishima et al., 2001). Exposure of cortical cultures to the A β 25–35 peptide (30 μ M) provoked a time-dependent increase in neuronal death as measured by the intensity of fluorescence after PI incorporation, the loss of neuronal viability evoked by A β 25–35 reaching ~65% after a 48 h exposure. However, this neurotoxic effect of the A β 25–35 peptide was not significant until after 18 h of treatment. In contrast, treatment with the reverse control peptide A β 35–25 did not produce any significant neurotoxicity, and control cultures exhibited ~19% cell death after a 48 h exposure to the peptide (supplemental Fig. 1A, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Soluble oligomeric forms of synthetic A β 1–42 have been shown to kill Neuro-2A neuroblastoma cells and mature neurons in organotypic cultures of tissue from the CNS (Lambert et al., 1998; Dahlgren et al., 2002). Moreover, recent studies have shown that oligomerization of endogenous A β is associated with neurite damage to cortical neurons and to the brain (Takahashi et al., 2004). We therefore studied the neurotoxicity of exogenous soluble oligomeric A β 1–42 in cortical neurons in culture.

Treatment of cortical cells with oligomeric A β 1–42 produced a time- and concentration-dependent reduction in neuronal viability (Fig. 1). The minimum effective concentration of A β 1–42 that induced a significant increase in the percentage of apoptotic nuclei was 100 nM (19%; $p = 0.025$), whereas the maximal neurotoxic effect was observed at a concentration of 10 μ M (Fig. 1A). The effect of this concentration of A β 1–42 was time dependent and was not significant until the cells had been exposed to the peptide for 24 h (Fig. 1B). The effect of A β 1–42 on neuronal death measured with PI staining was consistently higher than the effect on the percentage of apoptotic nuclei. For example, exposure of cultured cortical neurons to a 10 μ M concentration of A β 1–42 for 48 h increased PI staining within a 50–65% range (Fig. 1B). In comparison, the same treatment produced a 35–50% increase in the percentage of apoptotic nuclei (Fig. 1A). PI stains cells with damaged cytoplasmic membrane and provides an estimate of all cells that dye because of different processes (apoptosis as well as primary or secondary necrosis). In contrast, the percentage of condensed nuclei is a morphological assessment of cells that dye by apoptosis. The present results showing that A β 1–42 produces a higher increase in cell death than in apoptotic nuclei is consistent with previous studies showing that A β 1–42 may cause both apoptosis and necrosis in cultured neurons depending on the concentration and the time of exposure (Wei et al., 2002). Neuronal apoptosis usually requires the activation of caspase 3, produced by the proteolytic cleavage of its inactive zymogen into active fragments. To assess whether the apoptotic morphology induced by A β 1–42 was associated with activation of caspase 3, we performed immunocytochemistry studies using an antibody that recognizes only the active form of this enzyme. A β 1–42 (10 μ M) induced a marked increase (control, $3 \pm 0.5\%$ compared with A β , $15 \pm 3\%$) in the percentage of cortical cells in which caspase 3 was cleaved 48 h after exposure to oligomeric A β (Fig. 1C, bottom). Similarly, $52 \pm 2\%$ of cortical neurons treated with A β 1–42 displayed pyknotic nuclei compared with $20 \pm 1\%$ of neurons in control cultures (Fig. 1C, top).

A β increases NP1 expression before inducing neuronal death

Having defined the time course of A β neurotoxicity, we studied the accumulation of NP1 in cell extracts in the 24 h period before A β evokes significant membrane damage and neuronal death. The influence of either soluble A β 1–42 or A β 25–35 peptide on the accumulation of NP1 protein was studied as a function of the

time of exposure. Treatment with A β 25–35 did not modify the expression of NP1 during the first 8 h, but the levels of NP1 did increase ($327 \pm 48\%$ the control values) after a 12 h exposure. This increase in the levels of NP1 protein induced by A β 25–35 was sustained for up to 18 h and decreased after 24 h of treatment. In contrast, the levels of actin protein did not significantly change after exposure to the A β peptide during the period studied (supplemental Fig. 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

We next investigated the effect of A β oligomers on NP1 expression. Exposure to the oligomeric A β 1–42 produced a concentration-dependent increase in NP1 expression (10 μ M, $166 \pm 12\%$; 20 μ M, $194 \pm 27\%$), although this increase was not observed until 18 h after the exposure to the peptide (Fig. 2). Thus, compared with A β 25–35, the increase in NP1 accumulation after exposure to oligomeric A β 1–42 occurred later, and it was significantly lower at 24 h after the beginning of the treatment. Subsequent experiments showed that the effect of 20 μ M of A β 1–42 on NP1 expression was sustained and increased up to $458 \pm 77\%$ over control at 60 h after the beginning of treatment. Although a marked increase in the accumulation of NP1 evoked by A β 1–42 was observed at ~18 h after the beginning of the treatment (Fig. 2), the number of apoptotic nuclei does not appear to increase significantly until after 24 h of treatment with A β (Fig. 1). Hence, these results indicate that A β increases NP1 protein levels before the appearance of morphological signs of apoptosis.

Reduction in NP1 overexpression rescues cortical neurons from apoptosis evoked by A β

To examine whether NP1 overexpression is necessary for the neurotoxic effects of A β , we adopted two different strategies to reduce NP1 expression. These involved the use of antisense ODNs and the lentivirus-mediated transduction of an shRNAi, both targeted against NP1 mRNA. In previous studies, we have shown that an antisense but not sense ODN (NP1AS not NP1S) significantly reduces NP1 protein levels in cells (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001). Indeed, pretreatment of cortical neuronal cultures with NP1AS but not with the control ODN NP1S completely blocked the appearance of both apoptotic nuclei (Fig. 3A) and of cleaved caspase 3 (Fig. 3B) 48 h after treatment with oligomeric A β 1–42. This phenomenon was further confirmed when NP1 expression was silenced by RNAi. Lentivirus-mediated transduction of an shRNAi directed against NP1 transcripts significantly impaired the expression of NP1 protein evoked by oligomeric A β 1–42 (Fig. 3D). This effect appeared to be specific because an shRNAi expressing a random sequence did not affect the accumulation of NP1. Moreover, transduction of shRNAi-NP1 but not of shRNAi-Random prevented the appearance of apoptotic nuclei 48 h after exposure of cortical neuronal cultures to oligomeric A β 1–42 (Fig. 3C).

NP1 mediates the reduction in neurite outgrowth evoked by A β

Previous studies have shown that the neurite degeneration caused by A β in cultured neurons displays the morphological and biochemical characteristics of apoptosis (Ivins et al., 1998). Damage to neurites is one of the initial events in the process of neuronal death evoked by different apoptotic stimuli. Hence, because NP1 appears to mediate the apoptotic neuronal death induced by A β 1–42, we investigated the role of NP1 in the neurite degeneration evoked by A β . In the first series of experiments, we studied the effect of A β 1–42 on neurite length by immunohistochemis-

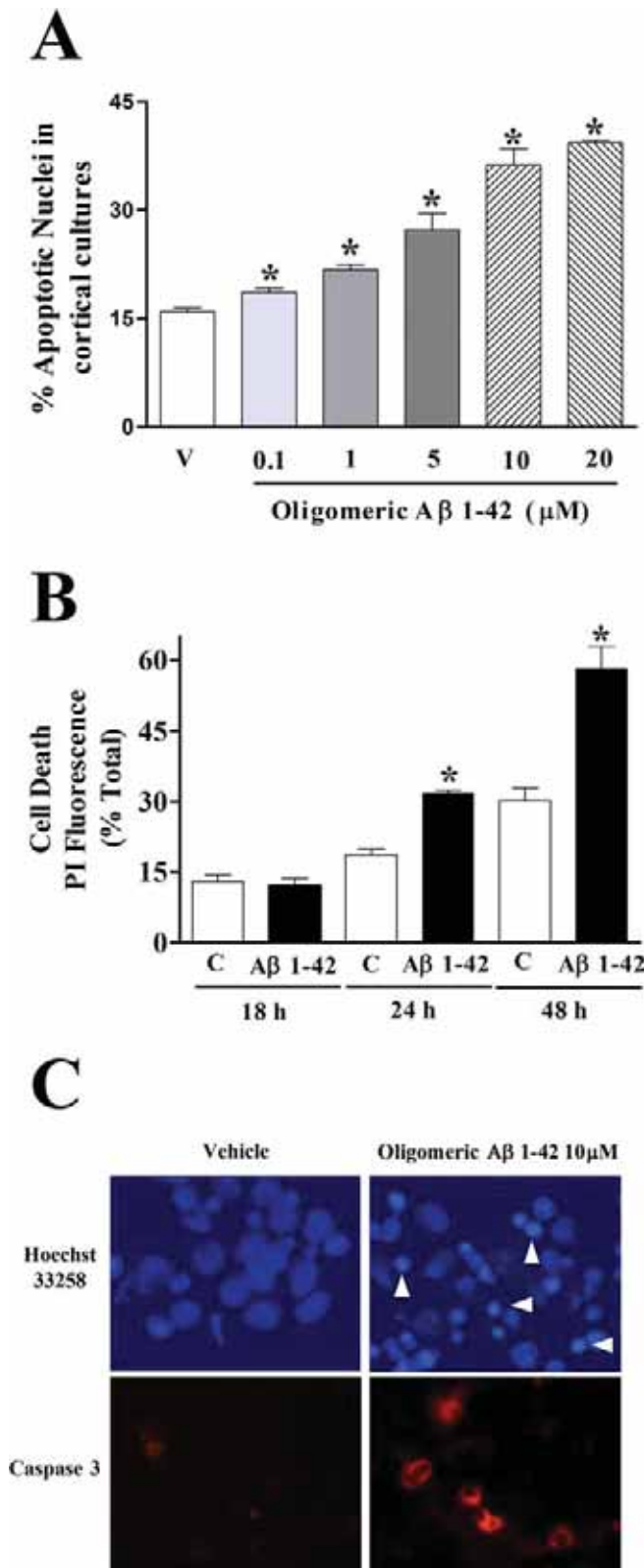


Figure 1. Oligomeric A β 1–42 induces apoptotic neuronal death. Cortical neuronal cultures (4–6 DIV) were treated with different concentrations of oligomeric A β 1–42. **A**, Soluble A β 1–42 increases the percentage of condensed nuclei in a concentration-dependent manner. Condensed nuclei were counted after Hoechst 33258 staining 48 h after treatment. V, Vehicle. **B**, Time course of neurotoxicity induced by soluble A β 1–42 (10 μ M). In these experiments, neuronal death was measured by counting the number of PI stained over total number of cells in digital images of fluorescence and phase-contrast photomicrographs simultaneously obtained in an inverted fluorescence microscope. C, Control. **C**, Representative photomicrographs

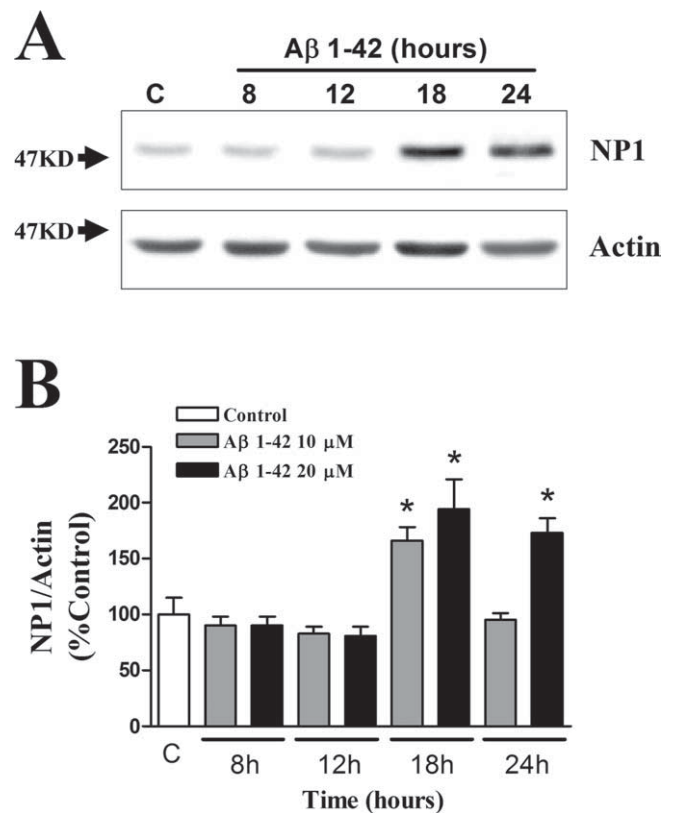
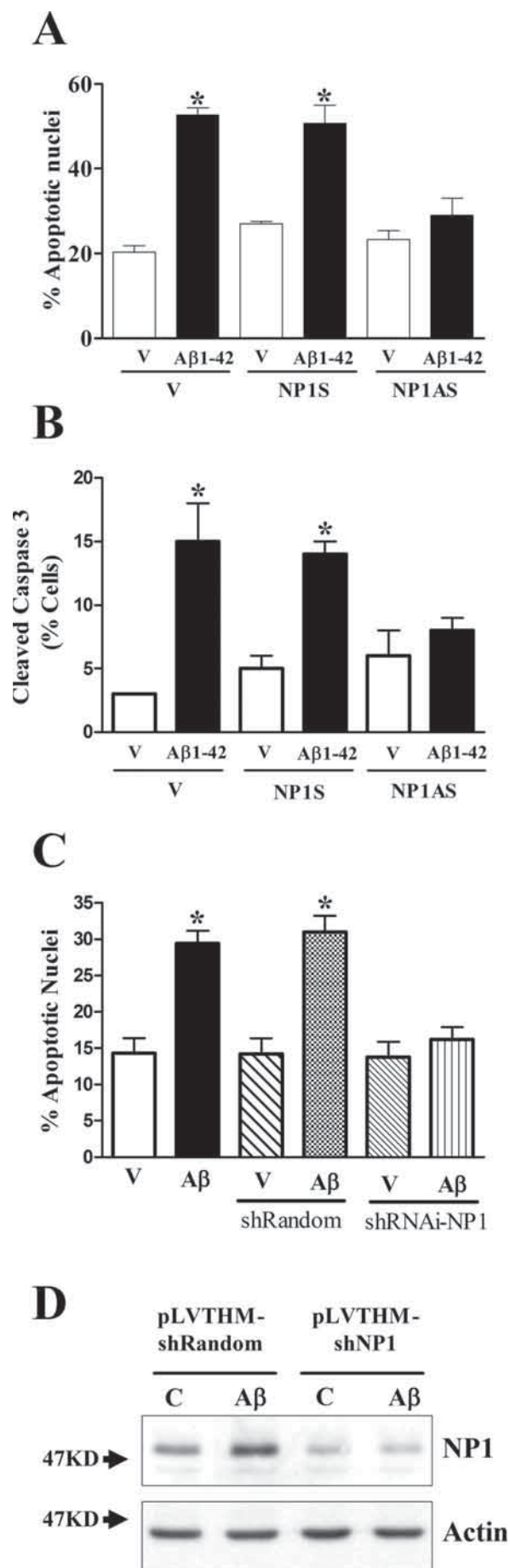


Figure 2. Oligomeric A β 1–42 increases NP1 expression in cortical neuronal cultures. **A**, Representative Western blot showing the effect of a maximal concentration of oligomeric A β 1–42 (20 μ M) on NP1 and actin levels over time. **B**, Quantitative analysis showing a concentration-dependent effect of oligomeric A β 1–42 (10 and 20 μ M) on NP1 protein levels. Western blots were incubated with mouse anti-NP1 antibody (1:1000). Densitometric values of the bands representing NP1 immunoreactivity were normalized with the values of the corresponding actin bands. The ratio of NP1 over actin was expressed as a percentage of the control values. Values are the mean \pm SEM of at least three independent experiments. * p < 0.05, significantly different from control values (one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* comparisons). C, Control.

try of the tubulin network (Fig. 4A). Treatment of low-density cultures of cortical neurons with oligomeric A β 1–42 (10 μ M) for 48 h produced a significant reduction (30%) in the length of the neurites developed by the cells (control, 217 \pm 10 μ m; A β , 150 \pm 11 μ m) (Fig. 4B). The reduction in neurite length evoked by A β 1–42 was antagonized by pretreatment with NP1AS but not with the control ODN NP1S (Fig. 4B). We also investigated the role of NP1 in the neurite damage induced by oligomeric A β 1–42 by silencing NP1 expression using RNAi (Fig. 4C). When the neurite length in cortical neurons was measured in digital phase-contrast images, a 24 h exposure to A β 1–42 (10 μ M) produced a marked reduction (36%) in the length of neurites developed by the cells (control, 215 \pm 12 μ m; A β , 137 \pm 9 μ m) (Fig. 4D). In addition, this effect of soluble A β 1–42 on neurite length was impaired by the transduction of shRNAi-NP1 but not of shRNAi-Random (Fig. 4C,D). To determine whether this effect of A β on

←

of cortical neuronal cultures treated with either vehicle or soluble A β 1–42 (10 μ M) for 48 h and stained with Hoechst 33258 (top) or after immunocytochemistry for cleaved caspase 3 (bottom). Arrowheads indicate condensed nuclei. The data shown are from three independent experiments and are expressed as a percentage of the values in control cultures. * p < 0.05, significantly different from the corresponding control (one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* comparisons).



neurite length was also present in dendrites, we first examined the extent of differentiation of our neuronal cultures at 5 DIV. Double-immunofluorescence and confocal microscopy studies showed that MAP2 (2a + 2b) segregates in dendrites surrounded by synapsin 1 puncta, indicating that our cortical cultured neurons are polarized (supplemental Fig. 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Subsequent studies showed that exposure to A β 1-42 (10 μ M) reduced the length of dendrites, and this effect was blocked by silencing NP1 expression with the transduction of shRNAi-NP1 (supplemental Fig. 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Silencing NP1 expression prevents synapse loss evoked by A β

Previous studies have shown that synapse loss occurs at early stages during progression of AD (Masliah et al., 2001). To analyze whether the reduction in neurite length evoked by A β is associated with synapse loss and to check whether this effect is also mediated by NP1 expression, we studied the effect of oligomeric A β 1-42 on the levels of the presynaptic vesicle protein synaptophysin. Treatment of cortical neuron cultures with oligomeric A β 1-42 (20 μ M) for 48 h produced a significant decrease (~60%) in the levels of synaptophysin. This effect was blocked by transduction of shRNAi-NP1, which silences NP1 expression, but not by transduction of the control hairpin shRNAi-Random (Fig. 5).

NP1 transgene overexpression reproduces the effects of A β in terms of neurite damage and apoptosis

To determine whether NP1 alone is capable of reproducing the neurotoxic effects of A β 1-42, we investigated the effect of lentivirus-mediated transgene overexpression of NP1 (Fig. 6). We treated cortical cells with the bicistronic lentiviral vectors pWPI-NP1, to induce the expression of a NP1 transgene and GFP, or with the control pWPI-GFP vector. The expression of GFP in cortical cells transduced with these vectors could be observed in 80–90% of neurons after 6 d treatment (data not shown). Likewise, there was a robust increase in NP1 protein levels after transduction with the pWPI-NP1 but not with the pWPI-GFP vector (Fig. 6A). This increase in NP1 protein was significantly diminished by RNAi of the NP1 message when pWPI-NP1 was cotransduced with the shRNAi-NP1 lentiviral vector. The increase in NP1 evoked by pWPI-NP1 was accompa-

Figure 3. Silencing NP1 expression rescues cortical neurons from apoptosis evoked by A β . Expression of NP1 was silenced with antisense ODNs or with lentiviral-mediated RNAi. **A, B**, Cortical neuronal cultures were transfected with either antisense (NP1AS) or the corresponding sense (NP1S) ODN (0.8 μ g) at 4 DIV, as described in Materials and Methods. Approximately 4 h later, neurons were treated with vehicle or oligomeric A β 1-42 (10 μ M). **A**, Apoptotic nuclei were measured with Hoechst 33258 staining 48 h after treatment with A β . **B**, The percentage of neurons with cleaved caspase 3 was measured by immunocytochemistry using a rabbit anti-human cleaved caspase-3 polyclonal antiserum 48 h after treatment with 10 μ M A β 1-42. **C**, Cortical neuronal cultures were transduced with a control lentivirus vector expressing a random sequence (pLVTHM-shRandom) or with a lentivirus vector expressing a short hairpin sequence that produces a small interfering RNA directed against NP1 mRNA (pLVTHM-shRNAi-NP1). Ten to 20 μ l of viral lentivirus particle stock were added at the same time of plating. The cells were treated with the vehicle or soluble A β 1-42 (10 μ M) at 4 DIV, and apoptotic nuclei were measured with Hoechst 33258 staining 48 h after treatment with A β . **D**, Representative Western blot showing a reduction in NP1 protein levels after exposure to lentivirus-mediated RNAi. Proteins were extracted 18 h after treatment with A β 1-42, separated on 10% SDS-PAGE, and transferred to PVDF membranes. Western blots were incubated with mouse anti-NP1 antibody (1:1000). * p < 0.05, significantly different from control values (one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* comparisons). Values are mean \pm SE of three independent experiments. V, Vehicle; C, control.

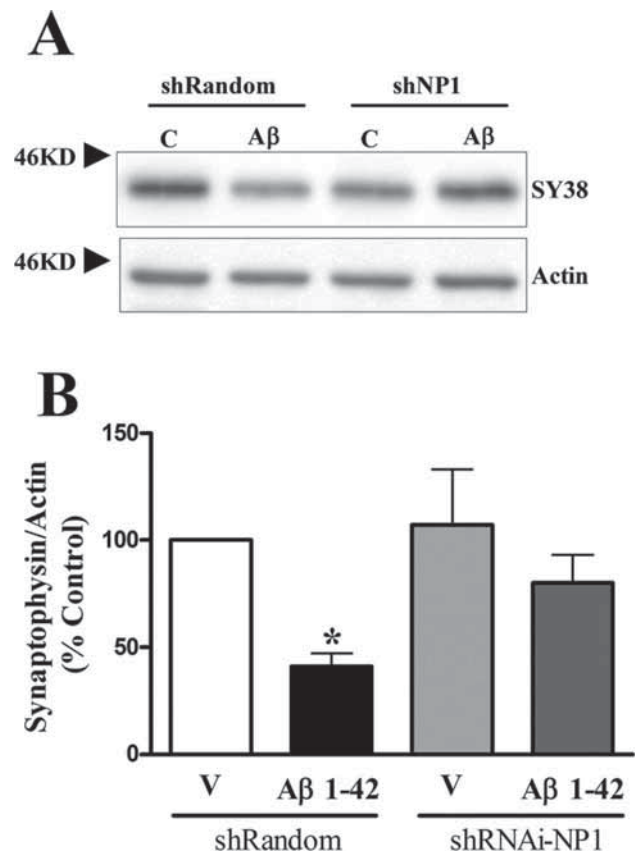
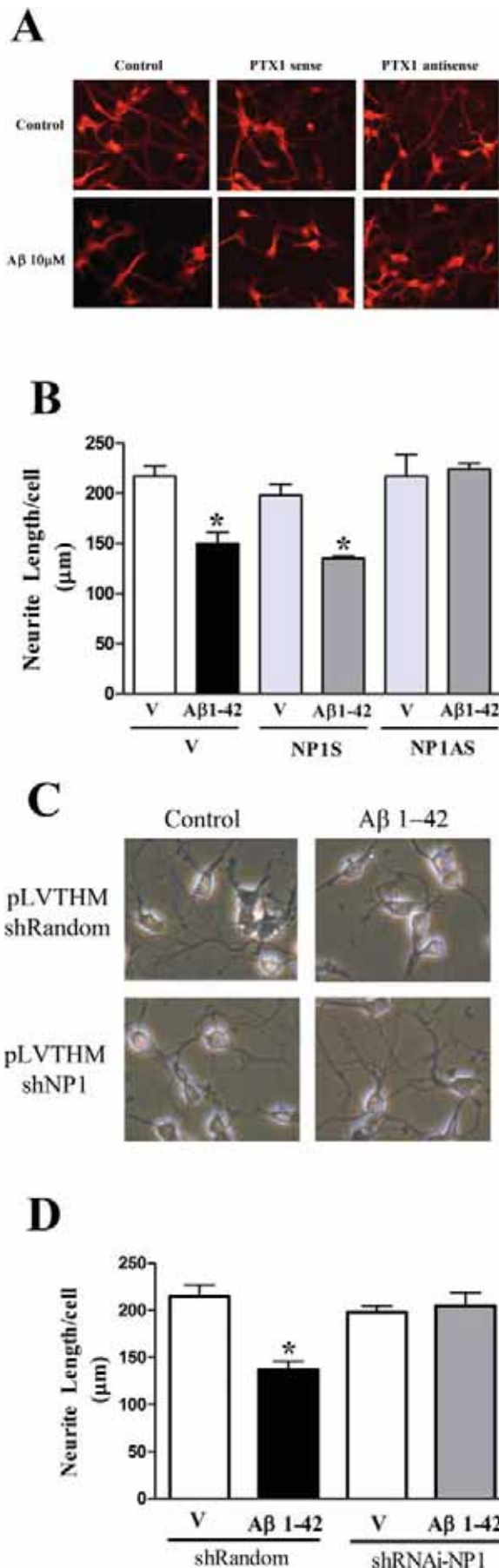


Figure 5. Silencing NP1 expression prevents synapse loss evoked by A β . Expression of NP1 was silenced with lentiviral-mediated RNAi. Cortical neuronal cultures were transfected with the control lentiviral vector pLVTHM-shRandom or with the lentiviral vector for RNAi against NP1, pLVTHM-shRNAi-NP1. Five microliters of viral lentivirus particle stock were added at the same time of plating. The cells were treated with vehicle or oligomeric A β 1–42 (20 μ M) at 5 DIV for 48 h. **A**, Representative Western blot showing a reduction in synaptophysin protein levels after exposure to A β . Proteins were extracted 48 h after treatment with A β 1–42. Western blots were incubated with mouse anti-synaptophysin antibody (SY38; 1:1000). Actin was used as control for protein loading. **B**, Quantitative analysis of the effects of A β and NP1 RNAi on synaptophysin levels. The densitometric values of the bands representing synaptophysin immunoreactivity were normalized to the values of the corresponding actin band. Values are mean \pm SE of three independent experiments. * p < 0.05, significantly different from control values (independent *t* test). C, Control; V, Vehicle.

nied by a 33% reduction in the length of neurites in neurons (210 \pm 11 μ m in neurons treated with the control vectors compared with 140 \pm 13 μ m in neurons overexpressing NP1) (Fig. 6C) and by a marked increase in the number of apoptotic nuclei

Figure 4. Silencing NP1 expression prevents the reduction in neurite outgrowth evoked by A β . Expression of NP1 was silenced with antisense ODNs or with lentiviral-mediated RNAi. **A, B**, Cortical neurons, plated at low density in Permax coverslides, were transfected with either antisense (NP1AS) or the corresponding sense (NP1S) ODN (0.8 μ g) at 1 DIV. Approximately 4 h later, neurons were treated with vehicle or soluble A β 1–42 (10 μ M) and fixed with 4% paraformaldehyde 48 h after treatment with A β . **A**, Representative immunofluorescence images of the tubulin network of cortical neuronal cultures assayed with anti- α -tyrosinated-tubulin monoclonal antibody. **B**, Total neurite length was estimated in photomicrographs of the tubulin network using a stereological procedure. **C**, Phase-contrast representative photomicrographs of cortical neurons transfected with a control lentivirus (pLVTHM-shRandom) or a lentivirus vector producing an NP1-specific small interfering RNA (pLVTHM-shRNAi-NP1). Lentivirus particles were added at the same time of plating, and treatment with vehicle or soluble A β 1–42 (10 μ M) was performed at 1 DIV. **D**, Total neurite length was estimated from phase-contrast photomicrographs obtained from living cells 24 h after treatment with A β using a stereological procedure (Ronn et al., 2000). Values are mean \pm SE of three independent experiments. * p < 0.05, significantly different from control values (one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* comparisons). V, Vehicle.

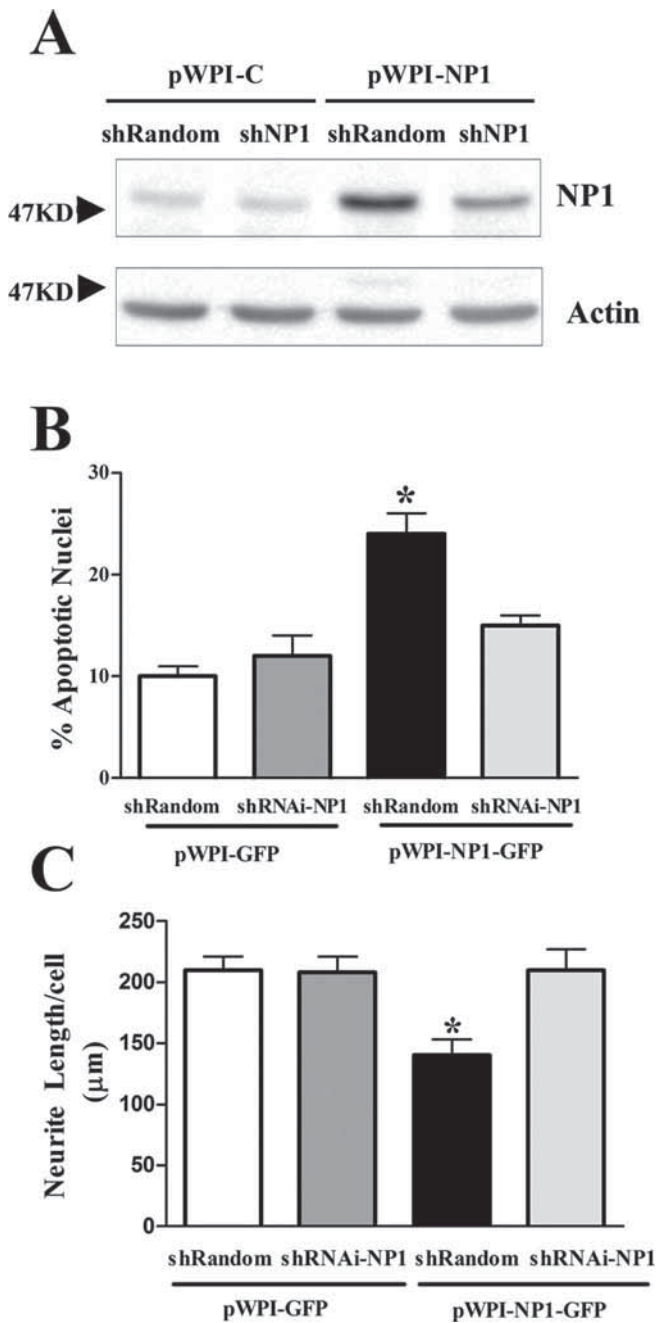


Figure 6. Transgene overexpression of NP1 increases apoptotic nuclei and reduces neurite outgrowth in cortical neuronal cultures. Cortical cells were treated with the bicistronic lentiviral vector for transgene expression of NP1 (pWPI-NP1) or with the control vector expressing GFP (pWPI-GFP). Silencing transgene expression of NP1 was performed with lentiviral-mediated RNAi. **A**, Representative Western blot showing that transduction of cortical neurons with the lentivirus vector carrying the NP1 transgene increases the levels of NP1 in protein extracts and that silencing NP1 expression by RNAi with pLVTHM-shRNAi-NP1 is capable of reducing NP1 transgene overexpression. Actin was used as control for protein loading. Neurons were transduced at the time of plating, and protein extracts were obtained at 6 DIV. Western blots were incubated with mouse anti-NP1 antibody (1:1000). **B**, Cortical neurons were transduced with the corresponding lentiviral vectors at the time of plating, and apoptotic nuclei were measured with Hoechst 33258 staining at 6 DIV. **C**, Cultures were transduced with the corresponding vectors, and total neurite length was estimated using a stereological procedure from phase-contrast photomicrographs obtained from living cells at 4 DIV. Values in **B** and **C** are mean \pm SE of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, significantly different from control values (one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* comparisons).

($8 \pm 1\%$ in controls compared with $23 \pm 4\%$ in neurons transduced with NP1) (Fig. 6B). Both of these effects were blocked by silencing the expression of NP1 with the shRNAi-NP1 viral vector.

NP1 analysis on Western blots of human brain homogenates
The antibody against NP1 used recognized a single band of ~ 54 kDa in homogenates of control and diseased human brain tissue. The intensity of the protein band recognized by this antibody was markedly augmented in tissue from AD cases. The specificity of this antibody for NP1 was confirmed by the fact that it failed to recognize this protein after preabsorption with recombinant GST-NP1 protein (Fig. 7A).

Localization of NP1 immunoreactivity in control and AD brains

We analyzed the distribution of NP1 in the brain by immunohistochemistry and found that NP1 immunoreactivity in the hippocampus and entorhinal cortex of control tissue was restricted to the neuropil. The internal plexiform layer of the CA3 area of the hippocampus and the hilus of the dentate gyrus were particularly enriched in punctate NP1-immunoreactive deposits. Preabsorption of the antibody with the recombinant GST-NP1 protein completely abolished this staining (data not shown). NP1 immunoreactivity in AD tissue decorated the neuritic component of senile plaques while the amyloid core remained negative (Fig. 7B,C). This immunoreactivity was specific because no staining was observed when the sections were incubated with the preabsorbed antibody (Fig. 7D). When dual immunohistochemistry for NP1 and phospho-tau (AT8 antibody) was performed, it was evident that NP1 colocalized with tau deposits of dystrophic neurites in neuritic plaques (Fig. 7E,F). Furthermore, neurons with neurofibrillary tangles were not recognized by the anti-NP1 antibody, and therefore the increase in NP1 immunoreactivity in the soma of individual neurons was not associated with intracytoplasmic phosphorylated tau deposition (Fig. 7E,F). Double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy confirmed that expression of NP1 is localized around $A\beta$ deposits in senile plaques in AD (Fig. 7G).

Moreover, mutant amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/PS1) transgenic mice displayed large numbers of $A\beta$ plaques in the cerebral cortex and hippocampus (Fig. 7H). Consecutive sections stained with anti-phospho-tau antibodies demonstrated the presence of small phospho-tau-immunoreactive deposits surrounding $A\beta$ plaques (Fig. 7I,J). Antibodies to NP1 disclosed a similar punctate pattern in association with $A\beta$ deposition.

Previous studies have shown that the synaptic protein SNAP-25 is highly expressed in dystrophic neurites in AD (Ferrer et al., 1998). To verify further the localization of NP1 in dystrophic neurites and its relationship with synaptic structures, we performed double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy analysis of NP1 and SNAP-25 in AD brains. The results show that NP1 and SNAP-25 colocalize in the majority of dystrophic neurites surrounding amyloid deposits in senile plaques (Fig. 8).

Discussion

There are distinct lines of evidence indicating that the accumulation of $A\beta$, and particularly of diffusible $A\beta_{1-42}$, is responsible for progressive neurodegeneration in AD. The characteristic sequence of events associated with this neurodegeneration commences with the early loss of synaptic contacts associated with the

initiation of cognitive decline, and this is followed by neurite damage, neuronal shrinkage, and, finally, selective neuronal loss (Klein, 2002; Walsh and Selkoe, 2004). However, the molecular mechanisms that mediate these neurotoxic effects of $A\beta$ remain to be characterized. Here, we report a novel mechanism that mediates $A\beta$ neurotoxicity, which involves the overexpression of NP1, a protein implicated in synapse formation and remodeling (Schlimgen et al., 1995; Xu et al., 2003) that, at the same time, has been associated with the apoptotic program of cell death triggered by reduction in neuronal activity in mature cerebellar granule neurons (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001; Enguita et al., 2005). Our experiments show that upregulation of NP1 expression contributes to synapse loss, neurite damage, and the subsequent apoptotic toxicity evoked by $A\beta$ in cortical neuronal cultures. Indeed, treatment with oligomeric $A\beta_{1-42}$ decreases synaptophysin levels, reduces neurite outgrowth, and increases the expression of NP1 before markers of neuronal apoptosis can be detected (e.g., pyknotic nuclei and the cleavage of caspase 3). Moreover, silencing the overexpression of NP1 with RNAi prevents both the synaptic damage and the neuronal apoptosis evoked by $A\beta$. In addition, our results show that there is a marked increase in NP1 protein levels in brain tissue from patients with late-onset AD. The finding that this increase in NP1 immunoreactivity is associated with dystrophic neurites in brain tissue with AD as well as in a transgenic animal model of AD provides additional neuropathological evidence in support of the hypothesis that NP1 plays a key role in the neurodegeneration characteristic of AD.

Soluble assemblies of synthetic $A\beta_{1-42}$ have been shown to be potent neurotoxins for different types of cell lines and organotypic cultures (Roher et al., 1996; Lambert et al., 1998; Hartley et al., 1999; Dahlgren et al., 2002). We have confirmed that synthetic oligomeric $A\beta_{1-42}$ does indeed induce a time- and concentration-dependent reduction in neuronal viability in primary cultures of cortical neurons. In accordance with previous studies, oligomeric $A\beta_{1-42}$ is a potent neurotoxin in culture, and a significant increase in apoptosis was observed at an effective concentration of 100 nM. This neurotoxicity was not observed until 48 h after the beginning of treatment, and when the time course of higher concentrations was analyzed, the viability of cortical cells appeared to be unaffected during the first 18–24 h of treatment. Nevertheless, $A\beta$ induces a marked increase (twofold to threefold) in the levels of the NP1 protein within this period. Indeed, the increase in NP1 occurs well before the appearance of any

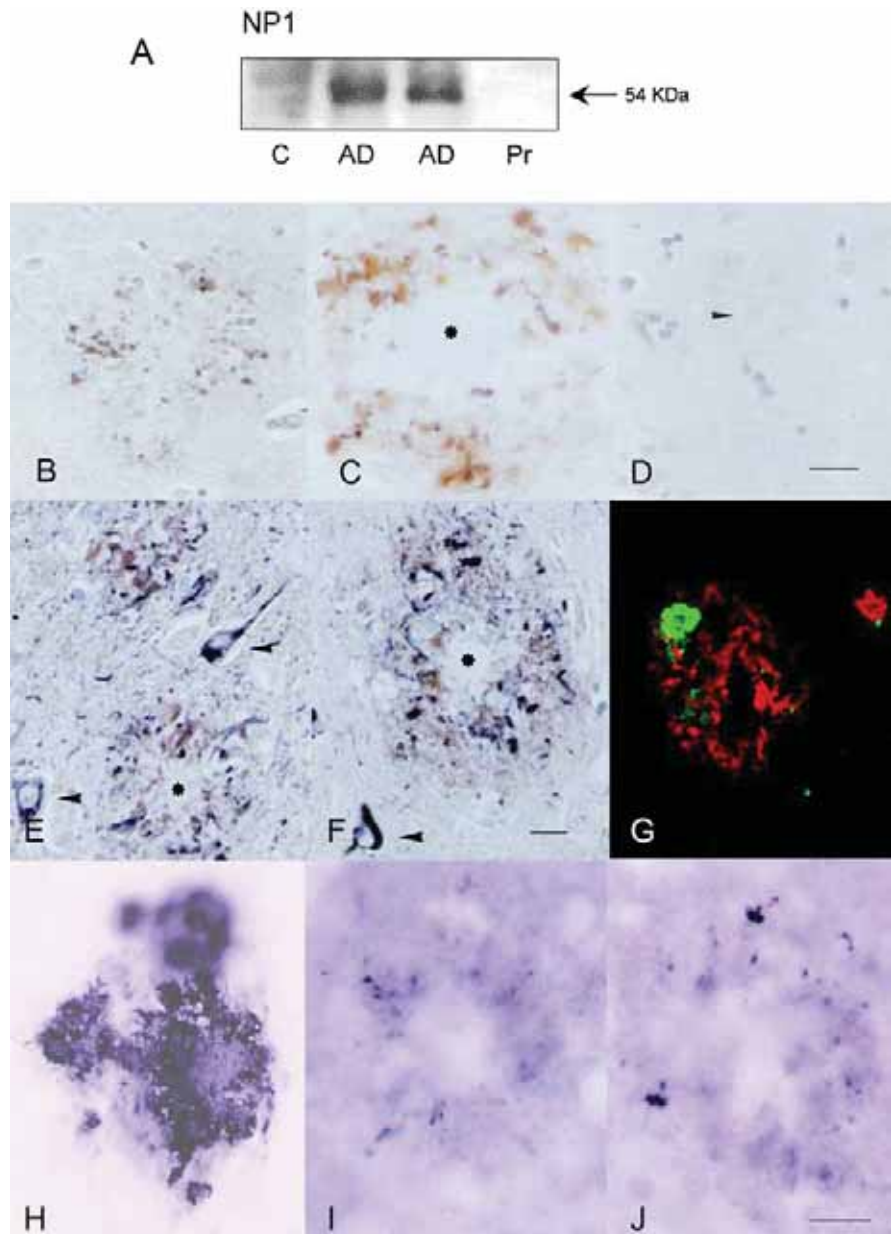


Figure 7. NP1 is expressed in abnormal neurites surrounding amyloid deposits of senile plaques in AD and transgenic mice. **A**, Western blots of hippocampal homogenates from control (C) and AD tissue showing a band of ~54 kDa, which is markedly increased in diseased brains. This band disappears after preabsorption (Pr) with the recombinant GST-NP1 protein. **B**, **C**, NP1 immunoreactivity is found in cellular processes surrounding amyloid cores (asterisk) in AD tissue. **D**, NP1 immunoreactivity is abolished after incubation of the primary antibody with the recombinant GST-NP1 protein. **E**, **F**, Dual immunohistochemistry for NP1 (brown precipitate) and phospho-tau (AT8; dark blue precipitate) shows colocalization of NP1 and tau in dystrophic neurites of senile plaques, but not in neurons with neurofibrillary tangles (arrowheads). **G**, NP1 (green) and amyloid (red) immunofluorescence and confocal microscopy of a senile plaque. NP1 is in close vicinity of amyloid deposits in a senile plaque. NP1 immunoreactivity is also observed in APP/PS1 transgenic mice. **H**, Cortical amyloid deposits in APP/PS1 transgenic mice. **I**, Increased phospho-tau immunoreactivity (anti-tau phospho-specific Thr¹⁸¹) in abnormal neurites surrounding amyloid cores. **J**, NP1 immunoreactivity has a similar localization, associated with amyloid cores in APP/PS1 transgenic mice. Cryostat sections with no counterstaining are shown. Scale bars: (in **D**) **B–D**, (in **J**) **H–J**, 25 μ m; (in **F**) **E**, **F**, 50 μ m.

morphological or biochemical sign of apoptosis, indicating that the regulation of NP1 expression is an early event in the neurotoxic cascade activated by $A\beta$. Silencing NP1 expression with either antisense ODNs or RNAi prevents the synaptic damage and the appearance of morphological and biochemical signs of apoptosis evoked by $A\beta$. Together with the observation that transgene overexpression of NP1 reproduces these neurotoxic

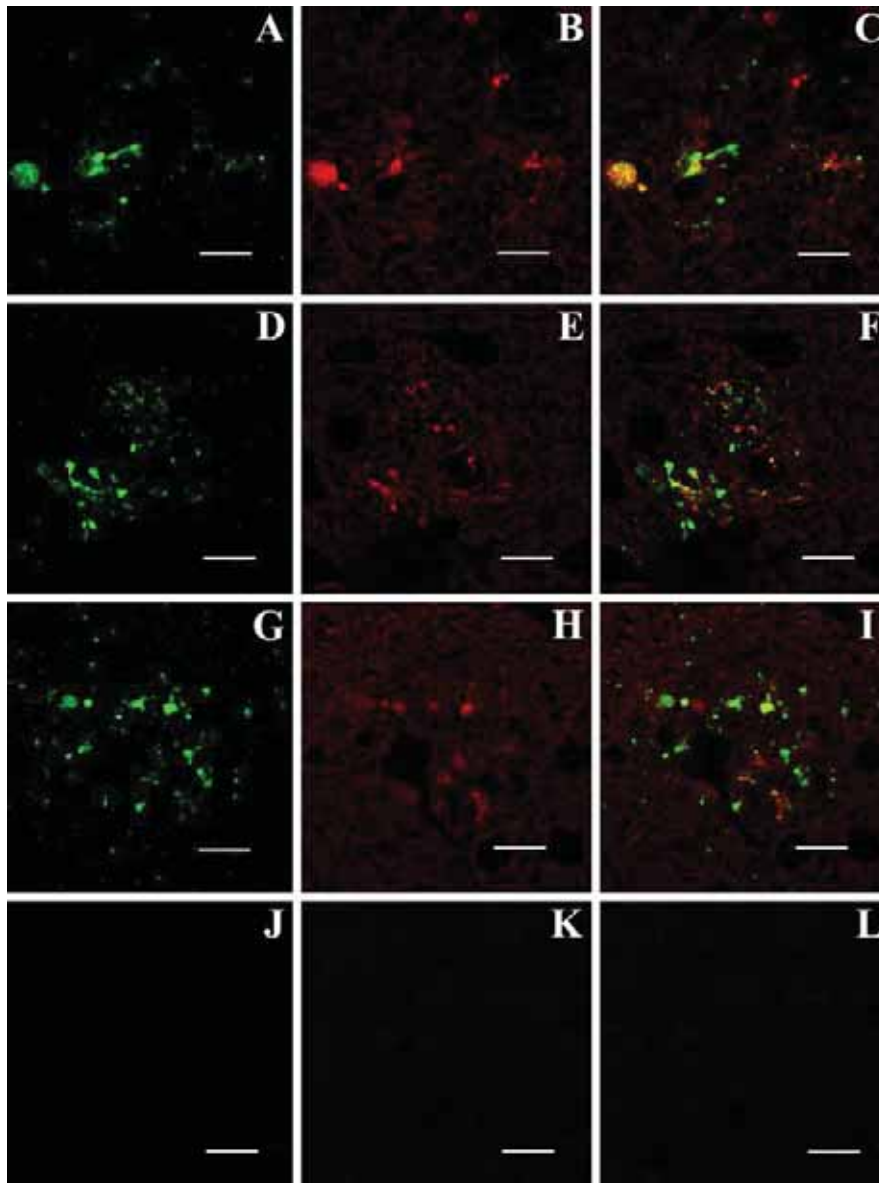


Figure 8. NP1 colocalizes with SNAP-25 in dystrophic neurites surrounding amyloid deposits. *A–I*, Double-labeling immunofluorescence to NP1 (green) and SNAP-25 (red) in three different senile plaques shows colocalization (merge, yellow) in the majority of abnormal neurites in human AD brains. *J–L*, Controls without the primary antibodies. Scale bars: *A–C*, 8 μ m; *D–L*, 16 μ m.

effects of A β , we present robust evidence that the regulation of NP1 expression contributes to A β neurotoxicity.

The relationship between NP1 and other factors known to contribute to A β neurotoxicity is presently unknown. Moreover, despite intense research, it remains unclear how A β interacts with neurons and triggers the biochemical signaling cascade that leads to neuronal dysfunction and neurotoxicity. The present results indicate that regulation of NP1 expression is part of this neurotoxic signaling cascade. We have previously shown that overexpression of NP1 contributes to cerebellar granule cell death evoked by reduction in neuronal activity (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001; Enguita et al., 2005). On the other hand, recent studies suggest that accumulation of A β may produce an excessive depression of excitatory synaptic transmission (Kamnetz et al., 2003). Therefore, we hypothesized that the signaling mechanisms activated by A β to produce neuronal dysfunction might be similar to those activated by the reduction in neuronal

activity in cerebellar granule cells. The finding that NP1 expression is necessary for the neurotoxic effects of A β is consistent

with this hypothesis. Thus, the present results suggest that the regulation of NP1 expression is part of a gene expression-dependent program of neurodegeneration activated by the accumulation of A β and that this shares mechanisms with the neuronal death process evoked by reduction in neuronal activity.

The intracellular signal transduction pathway through which A β induces the gene expression-dependent program of neurodegeneration and the upregulation of NP1 has not been characterized, but several studies suggest that one of the steps of this pathway is modulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) activity. Indeed, exposure of primary neuronal cultures to A β increases GSK3 activity (Takashima et al., 1998). Moreover, different laboratories have shown that inhibition of GSK3 activity blocks neurotoxicity evoked by A β (for review, see Bhat et al., 2004). Thus, A β -induced neurotoxicity is reduced by antisense GSK3 oligonucleotides (Takashima et al., 1993), by the GSK3 inhibitor lithium (Alvarez et al., 1999; Wei et al., 2000), and by the more specific GSK3 inhibitor AR-A014418 (Bhat et al., 2003). Furthermore, conditional overexpression of GSK3 in mice recapitulates different aspects of AD neuropathology (Engel et al., 2006). On the other hand, our previous studies indicate that GSK3 activity regulates NP1 expression. Thus, pharmacological reduction in GSK3 activity either with lithium or with the more specific GSK3 inhibitor SB415286 blocks NP1 overexpression and protects cerebellar granule neurons against death evoked by reduction in neuronal activity (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001; Enguita et al., 2005). Therefore, it is possible that A β induces overexpression

of NP1 by increasing GSK3 activity.

Evidence from different laboratories indicates that neuronal pentraxins may have several functions. Neuronal pentraxins were first proposed to participate in synapse formation and remodeling (Kirkpatrick et al., 2000; Schlimgen et al., 1995). In addition, NP1 and NP2 have been reported to mediate the synaptic clustering of AMPA glutamate receptors at a subset of excitatory synapses (Xu et al., 2003). Furthermore, the present results showing that overexpression of NP1 increases the percentage of neurons with apoptotic nuclei and cleaved caspase 3 provide additional evidence in support of the hypothesis that NP1 is part of the intrinsic program of apoptotic neuronal death activated by pathological stimuli in mature neurons. Nonetheless, which is the relationship among all of these different functions of NP1 and its role in the neuronal death program remains to be established. Mice that lack NP1 are viable, fertile, and show no obvious alteration in cerebral, cerebellar, hippocampal ultrastructure, or ob-

vious changes of gait or behavior (Kirkpatrick et al., 2000). Functional redundancy with other pentraxins or with other compensatory mechanisms during neuronal development may explain the absence of a clear phenotype in NP1 knock-out mice. However, our results with RNAi of NP1 expression reported here predict that NP1 knock-out mice should show resistance to the neurotoxic effects of A β . NP1 needs to be induced by reduction in neuronal activity to exert its pro-apoptotic effect. Thus, we would not expect NP1 knock-out mice to have a lethal overabundance of neurons. Mutant mice that lack NP2 and NPR are also available (Kirkpatrick et al., 2000). In future experiments, it will be interesting to determine whether the lack of these other pentraxins prevents the neurotoxic effects of A β oligomers.

The neuropathological results in brains from patients with AD and APP/PS1 transgenic mice reported here emphasize that the restriction of NP1 to the neuropil in control hippocampal and entorhinal cortical tissue is consistent with the synaptic localization of NP1. Moreover, the observation that dystrophic neurites but not the amyloid core of AD brains exhibit high NP1 immunoreactivity is additional evidence that A β overproduction triggers a process of neuronal damage similar to that observed in cerebellar granule cells after deafferentation. In support of the notion that NP1 immunoreactivity is associated with A β neurotoxicity, dual immunohistochemistry for NP1 and tau highlighted the colocalization of NP1 with tau deposits in dystrophic neurites in neuritic plaques. Similar observations regarding abnormal neurites containing NP1 in association with A β plaques were also found in APP/PS1 transgenic mice. The localization of NP1 and abnormal cell processes in AD brains were also supported by double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy studies showing that NP1 colocalizes with the synaptosomal-associated protein SNAP-25 in the majority of dystrophic neurites surrounding amyloid deposits in senile plaques. SNAP-25 has previously been reported to be reduced in the amyloid core but highly expressed in abnormal neurites surrounding amyloid deposits in AD (Ferrer et al., 1998).

High levels of A β selectively depress excitatory synaptic transmission in neurons that overexpress APP, as well as in nearby neurons that do not (Kamenetz et al., 2003). This phenomenon also suggests that A β activates a signal transduction pathway that, similarly to what occurs after reduction in neuronal activity, triggers the apoptotic program of neurodegeneration. The finding that silencing the expression of NP1 prevents the decrease in synaptophysin levels evoked by A β suggests that NP1 contributes to the synaptic damage evoked by A β and provides a molecular basis for this A β -induced depression of synaptic transmission. The interpretation that NP1 regulates synaptogenesis and synaptophysin levels in response to changes in neuronal activity is supported by recent studies showing that NP1 knock-out mice exhibit defects in the segregation of eye-specific retinal ganglion cell projections to the dorsal lateral geniculate nucleus, a process that involves activity-dependent synapse formation (Bjartmar et al., 2006). Moreover, NP1 has been proposed to regulate synaptogenesis by forming pentraxin heterocomplexes with NP2 (Xu et al., 2003). Expression of NP2 is responsive to activity, and it is rapidly upregulated by intense neuronal activation such as maximal electroconvulsive seizure (Xu et al., 2003). On the contrary, NP1 expression is rapidly increased by reduction in neuronal activity and causes cell death (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001; Enguita et al., 2005). Based on these observations, we propose that neuronal pentraxins might constitute a genetic switch that regulates neuronal death or survival depending on synaptic activity (DeGregorio-Rocasolano et al., 2001).

The observation that RNAi of NP1 expression prevents both the decrease in synaptophysin levels and the reduction in neurite outgrowth evoked by A β , together with the finding that NP1 is increased in dystrophic neurites in brains from AD patients, indicates that NP1 plays a key role in the synaptic degeneration that occurs in the early stages of AD. The mechanism by which NP1 modulates synaptophysin levels and neurite outgrowth is still unknown. Recently, it has been reported that the NPR with chromo domain (NPCD) interacts with the cytoplasmic catalytic phosphatase domain of the receptor protein tyrosine phosphatase PTPRO and that such interaction is required for NGF-induced neurite outgrowth (Chen and Bixby, 2005b). We speculate that the decrease in neurite outgrowth observed after overexpression of NP1 could be produced through an interaction of NP1 with the NPCD receptor that would subsequently alter the phosphatase activity of PTPRO required for neurite outgrowth. This hypothesis is currently under investigation.

In summary, we have shown that upregulation of NP1 expression plays a key role in the synaptic loss, neurite damage, and apoptotic neurotoxicity evoked by A β oligomers. These results, together with the finding that NP1 is increased in dystrophic neurites in brains with AD and in APP/PS1 transgenic mice, suggest that A β contributes to the pathology of AD by regulating NP1 expression. Future studies will determine the extent of the contribution of NP1 to the cognitive decline characteristic of AD.

References

- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453:260–264.
- Bhat R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, Radesater AC, Jerning E, Markgren PO, Borgegard T, Nylof M, Gimenez-Cassina A, Hernandez F, Lucas JJ, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem* 278:45937–45945.
- Bhat RV, Budd Haerberlein SL, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89:1313–1317.
- Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Renteria RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS (2006) Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 26:6269–6281.
- Braak H, Braak E (2001) Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: *Cerebral cortex. Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of cerebral cortex* (Peters A, Morrison JH, eds), pp 475–512. New York: Kluwer Academic/Plenum.
- Chen B, Bixby JL (2005a) A novel substrate of receptor tyrosine phosphatase PTPRO is required for nerve growth factor-induced process outgrowth. *J Neurosci* 25:880–888.
- Chen B, Bixby JL (2005b) Neuronal pentraxin with chromo domain (NPCD) is a novel class of protein expressed in multiple neuronal domains. *J Comp Neurol* 481:391–402.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine Jr WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277:32046–32053.
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78:151–164.
- DeGregorio-Rocasolano N, Gasull T, Trullas R (2001) Overexpression of neuronal pentraxin 1 is involved in neuronal death evoked by low K⁺ in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 276:796–803.
- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457–464.
- D'mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium—inhibition of death by insulin-like growth factor-I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10989–10993.

- Dodds DC, Omeis IA, Cushman SJ, Helms JA, Perin MS (1997) Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. *J Biol Chem* 272:21488–21494.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188–200.
- Engel T, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ (2006) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26:5083–5090.
- Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Abad A, Trullas R (2005) Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 67:1237–1246.
- Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE (1997) Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* 17:7736–7745.
- Ferrer I, Marti E, Tortosa A, Blasi J (1998) Dystrophic neurites of senile plaques are defective in proteins involved in exocytosis and neurotransmission. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:218–225.
- Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid β -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 19:8876–8884.
- Hsu YC, Perin MS (1995) Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization. *Genomics* 28:220–227.
- Ivins KJ, Bui ET, Cotman CW (1998) Beta-amyloid induces local neurite degeneration in cultured hippocampal neurons: evidence for neuritic apoptosis. *Neurobiol Dis* 5:365–378.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925–937.
- Kirkpatrick LL, Matzuk MM, Dodds DC, Perin MS (2000) Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. *J Biol Chem* 275:17786–17792.
- Klein WL (2002) A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41:345–352.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448–6453.
- Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7951–7955.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, Deteresa R, Hansen LA, McKeel Jr DW, Morris JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56:127–129.
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME (2001) β -Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21:7551–7560.
- O'Brien RJ, Xu D, Petralia RS, Steward O, Haganir RL, Worley P (1999) Synaptic clustering of AMPA receptors by the extracellular immediate-early gene product Narp. *Neuron* 23:309–323.
- Osmand AP, Friedenson B, Gewurz H, Painter RH, Hofmann T, Shelton E (1977) Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc Natl Acad Sci USA* 74:739–743.
- Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (1995) Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 64:253–265.
- Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR (1996) Morphology and toxicity of A β (1–42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271:20631–20635.
- Ronn LC, Ralets I, Hartz BP, Bech M, Berezin A, Berezin V, Moller A, Bock E (2000) A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J Neurosci Methods* 100:25–32.
- Rudolph JG, Lemasters JJ, Crews FT (1997) Use of a multiwell fluorescence scanner with propidium iodide to assess NMDA mediated excitotoxicity in rat cortical neuronal cultures. *Neurosci Lett* 221:149–152.
- Schlimgen AK, Helms JA, Vogel H, Perin MS (1995) Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system. *Neuron* 14:519–526.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791.
- Takahashi RH, Almeida CG, Kearney PF, Yu F, Lin MT, Milner TA, Gouras GK (2004) Oligomerization of Alzheimer's β -amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J Neurosci* 24:3592–3599.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7789–7793.
- Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, Ishiguro K, Yamaguchi H (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid beta peptide (25–35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 31:317–323.
- Tsui CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Barnes C, Worley PF (1996) Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *J Neurosci* 16:2463–2478.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181–193.
- Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D (2000) beta-amyloid peptide-induced death of PC12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol* 392:117–123.
- Wei W, Wang X, Kusiak JW (2002) Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *J Biol Chem* 277:17649–17656.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia; loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237–1239.
- Wiznerowicz M, Trono D (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77:8957–8961.
- Wiznerowicz M, Trono D (2005) Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends Biotechnol* 23:42–47.
- Xu D, Hopf C, Reddy R, Cho RW, Guo L, Lanahan A, Petralia RS, Wenthold RJ, O'Brien RJ, Worley P (2003) Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron* 39:513–528.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250:279–282.
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873–9880.

Abad,MA, M Enguita, N DeGregorio-Rocasolano, I Ferrer, R Trullas, 2006, Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid-beta and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain: *J.Neurosci.*, v. 26, p. 12735-12747.

Abraham,MC, S Shaham, 2004, Death without caspases, caspases without death: *Trends Cell Biol.*, v. 14, p. 184-193.

Abramov,AY, L Canevari, M R Duchen, 2004, Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase: *J.Neurosci.*, v. 24, p. 565-575.

Adams,JM, S Cory, 1998, The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival: *Science*, v. 281, p. 1322-1326.

Adams,JM, S Cory, 2002, Apoptosomes: engines for caspase activation: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 14, p. 715-720.

Akhtar,A, D Zink, P B Becker, 2000, Chromodomains are protein-RNA interaction modules: *Nature*, v. 407, p. 405-409.

Almeida,CG, D Tampellini, R H Takahashi, P Greengard, M T Lin, E M Snyder, G K Gouras, 2005, Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses: *Neurobiol.Dis.*, v. 20, p. 187-198.

Alvarez,G, J R Munoz-Montano, J Satrustegui, J Avila, E Bogonez, J Diaz-Nido, 1999, Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration: *FEBS Lett.*, v. 453, p. 260-264.

Amatniek,JC, W A Hauser, C DelCastillo-Castaneda, D M Jacobs, K Marder, K Bell, M Albert, J Brandt, Y Stern, 2006, Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease: *Epilepsia*, v. 47, p. 867-872.

Avila,J, F Hernandez, 2007, GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease: *Expert.Rev.Neurother.*, v. 7, p. 1527-1533.

Bales, KR, T Verina, R C Dodel, Y Du, L Altstiel, M Bender, P Hyslop, E M Johnstone, S P Little, D J Cummins, P Piccardo, B Ghetti, S M Paul, 1997, Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition [letter] [see comments]: *Nat.Genet.*, v. 17, p. 263-264.

Baltz, ML, D Caspi, D J Evans, I F Rowe, C R Hind, M B Pepys, 1986, Circulating serum amyloid P component is the precursor of amyloid P component in tissue amyloid deposits: *Clin.Exp.Immunol.*, v. 66, p. 691-700.

Barker, PA, 1998, p75NTR: A study in contrasts: *Cell Death.Differ.*, v. 5, p. 346-356.

Barks, JDE, F S Silverstein, 1992, Excitatory Amino Acids Contribute to the Pathogenesis of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury: *Brain Pathol.*, v. 2, p. 235-243.

Becker, EB, A Bonni, 2004, Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease: *Prog.Neurobiol.*, v. 72, p. 1-25.

Bertram, L, D Blacker, K Mullin, D Keeney, J Jones, S Basu, S Yhu, M G McInnis, R C Go, K Vekrellis, D J Selkoe, A J Saunders, R E Tanzi, 2000, Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q: *Science*, v. 290, p. 2302-2303.

Beurel, E, R S Jope, 2006, The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways: *Prog.Neurobiol.*, v. 79, p. 173-189.

Bhat, R, Y Xue, S Berg, S Hellberg, M Ormo, Y Nilsson, A C Radesater, E Jerning, P O Markgren, T Borgegard, M Nylof, A Gimenez-Cassina, F Hernandez, J J Lucas, J Diaz-Nido, J Avila, 2003, Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418: *J.Biol.Chem.*, v. 278, p. 45937-45945.

Bhat, RV, S L Budd Haeberlein, J Avila, 2004, Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies: *J Neurochem.*, v. 89, p. 1313-1317.

Bibel, M, Y A Barde, 2000, Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system: *Genes Dev.*, v. 14, p. 2919-2937.

Bibel,M, E Hoppe, Y A Barde, 1999, Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR: *EMBO J.*, v. 18, p. 616-622.

Bijur,GN, R S Jope, 2001, Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta: *J Biol.Chem.*, v. 276, p. 37436-37442.

Bijur,GN, R S Jope, 2003, Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria: *Neuroreport*, v. 14, p. 2415-2419.

Bixby,JL, 2000, Receptor tyrosine phosphatases in axon growth and guidance: *Neuroreport*, v. 11, p. R5-10.

Blurton-Jones,M, F M LaFerla, 2006, Pathways by which Abeta facilitates tau pathology: *Curr.Alzheimer Res.*, v. 3, p. 437-448.

Bonni,A, A Brunet, A E West, S R Datta, M A Takasu, M E Greenberg, 1999, Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms [see comments]: *Science*, v. 286, p. 1358-1362.

Borchelt,DR, G Thinakaran, C B Eckman, M K Lee, F Davenport, T Ratovitsky, C M Prada, G Kim, S Seekins, D Yager, H H Slunt, R Wang, M Seeger, A I Levey, S E Gandy, N G Copeland, N A Jenkins, D L Price, S G Younkin, S S Sisodia, 1996, Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo: *Neuron*, v. 17, p. 1005-1013.

Bozyczko-Coyne,D, T M O'Kane, Z L Wu, P Dobrzanski, S Murthy, J L Vaught, R W Scott, 2001, CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis: *J Neurochem.*, v. 77, p. 849-863.

Brandt,J, F W Bylsma, R Gross, O C Stine, N Ranen, C A Ross, 1996, Trinucleotide repeat length and clinical progression in Huntington's disease: *Neurology*, v. 46, p. 527-531.

Bredesen,DE, R V Rao, P Mehlen, 2006, Cell death in the nervous system: *Nature.*, v. 443, p. 796-802.

Breviario,F, E M d'Aniello, J Golay, G Peri, B Bottazzi, A Bairoch, S Saccone, R Marzella, V Predazzi, M Rocchi, ., 1992, Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component: *J.Biol.Chem.*, v. 267, p. 22190-22197.

Bruckner,SR, S P Tammariello, C Y Kuan, R A Flavell, P Rakic, S Estus, 2001, JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons: *Journal of Neurochemistry*, v. 78, p. 298-303.

Brunet,A, S R Datta, M E Greenberg, 2001, Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway: *Curr.Opin.Neurobiol.*, v. 11, p. 297-305.

Busciglio,J, A Lorenzo, B A Yankner, 1992, Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity: *Neurobiol.Aging*, v. 13, p. 609-612.

Buss,RR, W Sun, R W Oppenheim, 2006, Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development: *Annu.Rev.Neurosci.*, v. 29:1-35., p. 1-35.

Canossa,M, O Griesbeck, B Berninger, G Campana, R Kolbeck, H Thoenen, 1997, Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 94, p. 13279-13286.

Casaccia-Bonnefil,P, B D Carter, R T Dobrowsky, M V Chao, 1996, Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75: *Nature*, v. 383, p. 716-719.

Cedazo-Minguez,A, B O Popescu, J M Blanco-Millan, S Akterin, J J Pei, B Winblad, R F Cowburn, 2003, Apolipoprotein E and beta-amyloid (1-42) regulation of glycogen synthase kinase-3beta: *Journal of Neurochemistry*, v. 87, p. 1152-1164.

Chang,JY, J Z Wang, 1997, Morphological and biochemical changes during programmed cell death of rat cerebellar granule cells: *Neurochem.Res.*, v. 22, p. 43-48.

Chen,B, J L Bixby, 2005a, A novel substrate of receptor tyrosine phosphatase PTPRO is required for nerve growth factor-induced process outgrowth: *J.Neurosci.*, v. 25, p. 880-888.

Chen,B, J L Bixby, 2005b, Neuronal pentraxin with chromo domain (NPCD) is a novel class of protein expressed in multiple neuronal domains: *J Comp Neurol.*, v. 481, p. 391-402.

Chen,G, W Z Zeng, P X Yuan, L D Huang, Y M Jiang, Z H Zhao, H K Manji, 1999, The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS: *J Neurochem.*, v. 72, p. 879-882.

Chen,RW, D M Chuang, 1999, Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity: *J Biol.Chem.*, v. 274, p. 6039-6042.

Chen,YR, T H Tan, 2000, The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review): *Int.J.Oncol.*, v. 16, p. 651-662.

Cheng,EH, M C Wei, S Weiler, R A Flavell, T W Mak, T Lindsten, S J Korsmeyer, 2001, BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis: *Mol.Cell*, v. 8, p. 705-711.

Chipuk,JE, D R Green, 2005, Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 6, p. 268-275.

Cho,RW, J M Park, S B Wolff, D Xu, C Hopf, J A Kim, R C Reddy, R S Petralia, M S Perin, D J Linden, P F Worley, 2008, mGluR1/5-dependent long-term depression requires the regulated ectodomain cleavage of neuronal pentraxin NPR by TACE: *Neuron*, v. 57, p. 858-871.

Cleary,JP, D M Walsh, J J Hofmeister, G M Shankar, M A Kuskowski, D J Selkoe, K H Ashe, 2005, Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function: *Nat.Neurosci.*, v. 8, p. 79-84.

Cleveland,DW, 1999, From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS: *Neuron*, v. 24, p. 515-520.

Cohen,S, R Levi-Montalcini, V Hamburger, 1954, A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOM AS 37 AND 180: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 40, p. 1014-1018.

Corder,EH, A M Saunders, W J Strittmatter, D E Schmechel, P C Gaskell, G W Small, A D Roses, J L Haines, M A Pericak-Vance, 1993, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families: *Science*, v. 261, p. 921-923.

Cotman,CW, A J Anderson, 1995, A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease: *Mol.Neurobiol.*, v. 10, p. 19-45.

Cribbs,DH, W W Poon, R A Rissman, M Blurton-Jones, 2004, Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease: *Am.J.Pathol.*, v. 165, p. 353-355.

Cross,DA, D R Alessi, P Cohen, M Andjelkovich, B A Hemmings, 1995, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B: *Nature*, v. 378, p. 785-789.

Cross,DA, A A Culbert, K A Chalmers, L Facci, S D Skaper, A D Reith, 2001, Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death: *J Neurochem.*, v. 77, p. 94-102.

Crowder,RJ, R S Freeman, 1998, Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons: *J.Neurosci.*, v. 18, p. 2933-2943.

D'mello,SR, R Anelli, P Calissano, 1994, Lithium Induces Apoptosis in Immature Cerebellar Granule Cells But Promotes Survival of Mature Neurons: *Exp.Cell Res.*, v. 211, p. 332-338.

D'mello,SR, K Borodezt, S P Soltoff, 1997, Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling: *J Neurosci*, v. 17, p. 1548-1560.

D'mello,SR, C Galli, T Ciotti, P Calissano, 1993, Induction of Apoptosis in Cerebellar Granule Neurons by Low Potassium - Inhibition of Death by Insulin-Like Growth Factor-I and cAMP: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, v. 90, p. 10989-10993.

Dahlgren,KN, A M Manelli, W B Stine, Jr., L K Baker, G A Krafft, M J LaDu, 2002, Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability: *J Biol.Chem.*, v. 277, p. 32046-32053.

Davey,F, A M Davies, 1998, TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons: *Curr.Biol.*, v. 8, p. 915-918.

Davies,CA, D M Mann, P Q Sumpter, P O Yates, 1987, A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease: *J Neurol.Sci.*, v. 78, p. 151-164.

Davis,RJ, 2000, Signal transduction by the JNK group of MAP kinases: *Cell*, v. 103, p. 239-252.

DeGregorio-Rocasolano,N, T Gasull, R Trullas, 2001, Overexpression of Neuronal Pentraxin 1 Is Involved in Neuronal Death Evoked by Low K⁺ in Cerebellar Granule Cells: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 796-803.

Diehl,JA, M Cheng, M F Roussel, C J Sherr, 1998, Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization: *Genes Dev.*, v. 12, p. 3499-3511.

Dodds,D, A K Schlimgen, S Y Lu, M S Perin, 1995, Novel reticular calcium binding protein is purified on taipoxin columns: *Journal of Neurochemistry*, v. 64, p. 2339-2344.

Dodds,DC, I A Omeis, S J Cushman, J A Helms, M S Perin, 1997, Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49: *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 21488-21494.

Dudek,H, S R Datta, T F Franke, M J Birnbaum, R Yao, G M Cooper, R A Segal, D R Kaplan, M E Greenberg, 1997, Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt [see comments]: *Science*, v. 275, p. 661-665.

Earnshaw,WC, L M Martins, S H Kaufmann, 1999, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis: *Annu.Rev.Biochem.*, v. 68, p. 383-424.

Elbashir,SM, W Lendeckel, T Tuschl, 2001, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs: *Genes Dev.*, v. 15, p. 188-200.

Ellis,HM, H R Horvitz, 1986, Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*: *Cell*, v. 44, p. 817-829.

Ellis,RE, J Y Yuan, H R Horvitz, 1991, Mechanisms and functions of cell death: *Annu.Rev.Cell Biol.*, v. 7:663-98, p. 663-698.

Emsley,J, H E White, B P O'Hara, G Oliva, N Srinivasan, I J Tickle, T L Blundell, M B Pepys, S P Wood, 1994, Structure of pentameric human serum amyloid P component: *Nature*, v. 367, p. 338-345.

Engel,T, F Hernandez, J Avila, J J Lucas, 2006, Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3: *J.Neurosci.*, v. 26, p. 5083-5090.

Enguita,M, N DeGregorio-Rocasolano, A Abad, R Trullas, 2005, Glycogen synthase kinase 3 activity mediates neuronal pentraxin 1 expression and cell death induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells: *Mol.Pharmacol.*, v. 67, p. 1237-1246.

Ertekin-Taner,N, N Graff-Radford, L H Younkin, C Eckman, M Baker, J Adamson, J Ronald, J Blangero, M Hutton, S G Younkin, 2000, Linkage of plasma A β 42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees: *Science*, v. 290, p. 2303-2304.

Esler,WP, W T Kimberly, B L Ostaszewski, T S Diehl, C L Moore, J Y Tsai, T Rahmati, W Xia, D J Selkoe, M S Wolfe, 2000, Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1: *Nat.Cell Biol.*, v. 2, p. 428-434.

Estus,S, H M Tucker, C van Rooyen, S Wright, E F Brigham, M Wogulis, R E Rydel, 1997, Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction: *J.Neurosci.*, v. 17, p. 7736-7745.

Estus,S, W J Zaks, R S Freeman, M Gruda, R Bravo, E M Johnson, Jr., 1994, Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis: *J Cell Biol.*, v. 127, p. 1717-1727.

Fadok,VA, D R Voelker, P A Campbell, J J Cohen, D L Bratton, P M Henson, 1992, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages: *J.Immunol.*, v. 148, p. 2207-2216.

Ferrer,I, E Marti, A Tortosa, J Blasi, 1998, Dystrophic neurites of senile plaques are defective in proteins involved in exocytosis and neurotransmission: *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, v. 57, p. 218-225.

Friedman,WJ, L A Greene, 1999, Neurotrophin signaling via Trks and p75: *Exp.Cell Res.*, v. 253, p. 131-142.

Galli,C, O Meucci, A Scorziello, T M Werge, P Calissano, G Schettini, 1995, Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: The involvement of intracellular calcium and RNA synthesis: *J.Neurosci.*, v. 15, p. 1172-1179.

Gallo,KA, G L Johnson, 2002, Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 3, p. 663-672.

Gallo,V, A Kingsbury, R Balazs, O S Jorgensen, 1987, The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture: *J.Neurosci.*, v. 7, p. 2203-2213.

Galve-de Rochemonteix,B, K Wiktorowicz, I Kushner, J M Dayer, 1993, C-reactive protein increases production of IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF-alpha, and expression of mRNA by human alveolar macrophages: *J.Leukoc.Biol.*, v. 53, p. 439-445.

Games,D, D Adams, R Alessandrini, R Barbour, P Berthelette, C Blackwell, T Carr, J Clemens, T Donaldson, F Gillespie, ., 1995, Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein: *Nature*, v. 373, p. 523-527.

Gao,XB, A N van den Pol, 2001, Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus: *J.Physiol*, v. 533, p. 237-252.

Gewurz,H, X H Zhang, T F Lint, 1995, Structure and function of the pentraxins: *Curr.Opin.Immunol.*, v. 7, p. 54-64.

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

Goldgaber,D, M I Lerman, O W McBride, U Saffiotti, D C Gajdusek, 1987, Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease: *Science*, v. 235, p. 877-880.

Goodman,AR, T Cardozo, R Abagyan, A Altmeyer, H G Wisniewski, J Vilcek, 1996, Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions: *Cytokine.Growth Factor.Rev.*, v. 7, p. 191-202.

Graeber,MB, L B Moran, 2002, Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts: *Brain Pathol.*, v. 12, p. 385-390.

Gray,EG, M Paula-Barbosa, A Roher, 1987, Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes: *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*, v. 13, p. 91-110.

Green,DR, 1998, Apoptotic pathways: the roads to ruin: *Cell*, v. 94, p. 695-698.

Grimes,CA, R S Jope, 2001, The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling: *Prog.Neurobiol.*, v. 65, p. 391-426.

Gross,A, J M McDonnell, S J Korsmeyer, 1999, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis: *Genes Dev.*, v. 13, p. 1899-1911.

Gupta,S, T Barrett, A J Whitmarsh, J Cavanagh, H K Sluss, B Derijard, R J Davis, 1996, Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors: *EMBO J.*, v. 15, p. 2760-2770.

Haass,C, M G Schlossmacher, A Y Hung, C Vigo-Pelfrey, A Mellon, B L Ostaszewski, I Lieberburg, E H Koo, D Schenk, D B Teplow, ., 1992, Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism: *Nature*, v. 359, p. 322-325.

Ham,J, C Babij, J Whitfield, C M Pfarr, D Lallemand, M Yaniv, L L Rubin, 1995, A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death: *Neuron*, v. 14, p. 927-939.

Hamburger,V, 1992, History of the discovery of neuronal death in embryos: *J.Neurobiol.*, v. 23, p. 1116-1123.

Hamburger,V, R Levi-Montalcini, 1949, Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions: *J.Exp.Zool.*, v. 111, p. 457-501.

Han,J, J D Lee, L Bibbs, R J Ulevitch, 1994, A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells: *Science*, v. 265, p. 808-811.

Hardy,DM, M N Oda, D S Friend, T T Huang, Jr., 1991, A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction: *Biochem.J.*, v. 275 (Pt 3), p. 759-766.

Hardy,J, 1997, The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 94, p. 2095-2097.

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

Harper,SJ, P LoGrasso, 2001, Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38: *Cell Signal.*, v. 13, p. 299-310.

Harris,C, A C Maroney, E M Johnson, Jr., 2002a, Identification of JNK-dependent and -independent components of cerebellar granule neuron apoptosis: *J Neurochem.*, v. 83, p. 992-1001.

Harris,CA, M Deshmukh, B Tsui-Pierchala, A C Maroney, E M Johnson, Jr., 2002b, Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway by the mixed lineage kinase

inhibitor CEP-1347 (KT7515) preserves metabolism and growth of trophic factor-deprived neurons: *J Neurosci.*, v. 22, p. 103-113.

Hartigan,JA, G V Johnson, 1999, Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway: *J.Biol.Chem.*, v. 274, p. 21395-21401.

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

Hauser,WA, M L Morris, L L Heston, V E Anderson, 1986, Seizures and myoclonus in patients with Alzheimer's disease: *Neurology*, v. 36, p. 1226-1230.

Hengartner,MO, 2000, The biochemistry of apoptosis: *Nature*, v. 407, p. 770-776.

Hofmann,K, 1999, The modular nature of apoptotic signaling proteins: *Cell Mol.Life Sci.*, v. 55, p. 1113-1128.

Holgado-Madruga,M, D K Moscatello, D R Emlet, R Dieterich, A J Wong, 1997, Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 94, p. 12419-12424.

Hoshi,M, A Takashima, K Noguchi, M Murayama, M Sato, S Kondo, Y Saitoh, K Ishiguro, T Hoshino, K Imahori, 1996, Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 93, p. 2719-2723.

Hossain,MA, J C Russell, R O'Brien, J Laterra, 2004, Neuronal pentraxin 1: a novel mediator of hypoxic-ischemic injury in neonatal brain: *J.Neurosci.*, v. 24, p. 4187-4196.

Hsia,AY, E Masliah, L McConlogue, G Q Yu, G Tatsuno, K Hu, D Kholodenko, R C Malenka, R A Nicoll, L Mucke, 1999, Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 96, p. 3228-3233.

Hsiao,K, P Chapman, S Nilsen, C Eckman, Y Harigaya, S Younkin, F Yang, G Cole, 1996, Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice: *Science*, v. 274, p. 99-102.

Hsieh,H, J Boehm, C Sato, T Iwatsubo, T Tomita, S Sisodia, R Malinow, 2006, AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss: *Neuron*, v. 52, p. 831-843.

Hsu,YC, M S Perin, 1995, Human neuronal pentraxin II (NPTX2): conservation, genomic structure, and chromosomal localization: *Genomics*, v. 28, p. 220-227.

Huang,B, M Eberstadt, E T Olejniczak, R P Meadows, S W Fesik, 1996, NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain: *Nature*, v. 384, p. 638-641.

Hughes,K, E Nikolakaki, S E Plyte, N F Totty, J R Woodgett, 1993, Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation: *EMBO J*, v. 12, p. 803-808.

Hutton,M, C L Lendon, P Rizzu, M Baker, S Froelich, H Houlden, S Pickering-Brown, S Chakraverty, A Isaacs, A Grover, J Hackett, J Adamson, S Lincoln, D Dickson, P Davies, R C Petersen, M Stevens, E de Graaff, E Wauters, J van Baren, M Hillebrand, M Joosse, J M Kwon, P Nowotny, L K Che, J Norton, J C Morris, L A Reed, J Trojanowski, H Basun, L Lannfelt, M Neystat, S Fahn, F Dark, T Tannenberg, P R Dodd, N Hayward, J B Kwok, P R Schofield, A Andreadis, J Snowden, D Craufurd, D Neary, F Owen, B A Oostra, J Hardy, A Goate, J van Swieten, D Mann, T Lynch, P Heutink, 1998, Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17: *Nature*, v. 393, p. 702-705.

Introna,M, F Breviario, E M d'Aniello, J Golay, E Dejana, A Mantovani, 1993, IL-1 inducible genes in human umbilical vein endothelial cells: *Eur.Heart J.*, v. 14 Suppl K, p. 78-81.

Ip,YT, R J Davis, 1998, Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 10, p. 205-219.

Itoh,N, S Nagata, 1993, A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen: *J.Biol.Chem.*, v. 268, p. 10932-10937.

Itoh,N, S Yonehara, A Ishii, M Yonehara, S Mizushima, M Sameshima, A Hase, Y Seto, S Nagata, 1991, The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis: *Cell*, v. 66, p. 233-243.

Ivins,KJ, E T Bui, C W Cotman, 1998, Beta-amyloid induces local neurite degeneration in cultured hippocampal neurons: evidence for neuritic apoptosis: *Neurobiol.Dis.*, v. 5, p. 365-378.

Jiang,Y, C Chen, Z Li, W Guo, J A Gegner, S Lin, J Han, 1996, Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta): *J.Biol.Chem.*, v. 271, p. 17920-17926.

Jiang,Y, H Gram, M Zhao, L New, J Gu, L Feng, F Di Padova, R J Ulevitch, J Han, 1997, Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 30122-30128.

Johnson,GL, R Lapadat, 2002, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases: *Science*, v. 298, p. 1911-1912.

Johnson,KG, D Van Vactor, 2003, Receptor protein tyrosine phosphatases in nervous system development: *Physiol Rev.*, v. 83, p. 1-24.

Johnston,MV, 1997, Hypoxic and ischemic disorders of infants and children. Lecture for 38th meeting of Japanese Society of Child Neurology, Tokyo, Japan, July 1996: *Brain Dev.*, v. 19, p. 235-239.

Johnston,MV, 2001, Excitotoxicity in neonatal hypoxia: *Ment.Retard.Dev.Disabil.Res.Rev.*, v. 7, p. 229-234.

Johnston,MV, W H Trescher, A Ishida, W Nakajima, 2001, Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain: *Pediatr.Res.*, v. 49, p. 735-741.

Kalaria,RN, M Harshbarger-Kelly, D L Cohen, D R Premkumar, 1996, Molecular aspects of inflammatory and immune responses in Alzheimer's disease: *Neurobiol.Aging*, v. 17, p. 687-693.

Kamenetz,F, T Tomita, H Hsieh, G Seabrook, D Borchelt, T Iwatsubo, S Sisodia, R Malinow, 2003, APP processing and synaptic function: *Neuron*, v. 37, p. 925-937.

Kelly,BL, A Ferreira, 2006, beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons: *J.Biol.Chem.*, v. 281, p. 28079-28089.

Khursigara,G, J R Orlinick, M V Chao, 1999, Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6: *J.Biol.Chem.*, v. 274, p. 2597-2600.

Kim,E, M Sheng, 2004, PDZ domain proteins of synapses: *Nat.Rev.Neurosci.*, v. 5, p. 771-781.

Kirkpatrick,LL, M M Matzuk, D C Dodds, M S Perin, 2000, Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. NEURONAL PENTRAXIN (NP) RECEPTOR BINDS TO TAIPOXIN AND TAIPOXIN-ASSOCIATED CALCIUM-BINDING PROTEIN 49 VIA NP1 AND NP2: *J Biol.Chem.*, v. 275, p. 17786-17792.

Klein,WL, 2002, Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets: *Neurochem.Int.*, v. 41, p. 345-352.

Kroemer,G, S J Martin, 2005, Caspase-independent cell death: *Nat.Med.*, v. 11, p. 725-730.

Kumari,S, X Liu, T Nguyen, X Zhang, S R D'mello, 2001, Distinct phosphorylation patterns underlie Akt activation by different survival factors in neurons: *Brain Res.Mol.Brain Res.*, v. 96, p. 157-162.

Kuner,P, R Schubengel, C Hertel, 1998, Beta-amyloid binds to p57NTR and activates NFkappaB in human neuroblastoma cells: *J.Neurosci.Res.*, v. 54, p. 798-804.

Kyriakis,JM, P Banerjee, E Nikolakaki, T Dai, E A Rubie, M F Ahmad, J Avruch, J R Woodgett, 1994, The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases: *Nature*, v. 369, p. 156-160.

LaFerla,FM, K N Green, S Oddo, 2007, Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease: *Nat.Rev.Neurosci.*, v. 8, p. 499-509.

Lambert,MP, A K Barlow, B A Chromy, C Edwards, R Freed, M Liosatos, T E Morgan, I Rozovsky, B Trommer, K L Viola, P Wals, C Zhang, C E Finch, G A Krafft, W L

Klein, 1998, Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 95, p. 6448-6453.

Le Niculescu,H, E Bonfoco, Y Kasuya, F X Claret, D R Green, M Karin, 1999, Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death: *Mol.Cell Biol.*, v. 19, p. 751-763.

Lee,GW, A R Goodman, T H Lee, J Vilcek, 1994a, Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins: *J.Immunol.*, v. 153, p. 3700-3707.

Lee,JC, J T Laydon, P C McDonnell, T F Gallagher, S Kumar, D Green, D McNulty, M J Blumenthal, J R Heys, S W Landvatter, ., 1994b, A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis: *Nature*, v. 372, p. 739-746.

Lee,TH, G W Lee, E B Ziff, J Vilcek, 1990, Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts: *Mol.Cell Biol.*, v. 10, p. 1982-1988.

Leroy,K, J P Brion, 1999, Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain: *J.Chem.Neuroanat.*, v. 16, p. 279-293.

Lesort,M, R S Jope, G V Johnson, 1999, Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase: *Journal of Neurochemistry*, v. 72, p. 576-584.

Levi-Montalcini,R, 1987, The nerve growth factor: thirty-five years later: *EMBO J.*, v. 6, p. 1145-1154.

Levy-Lahad,E, W Wasco, P Poorkaj, D M Romano, J Oshima, W H Pettingell, C E Yu, P D Jondro, S D Schmidt, K Wang, ., 1995, Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus: *Science*, v. 269, p. 973-977.

Lewis,J, D W Dickson, W L Lin, L Chisholm, A Corral, G Jones, S H Yen, N Sahara, L Skipper, D Yager, C Eckman, J Hardy, M Hutton, E McGowan, 2001, Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP: *Science*, v. 293, p. 1487-1491.

Li,M, V O Ona, C Guegan, M Chen, V Jackson-Lewis, L J Andrews, A J Olszewski, P E Stieg, J P Lee, S Przedborski, R M Friedlander, 2000a, Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model: *Science*, v. 288, p. 335-339.

Li,SH, S Lam, A L Cheng, X J Li, 2000b, Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis: *Hum.Mol.Genet.*, v. 9, p. 2859-2867.

Li,Y, D A Kirschmann, L L Wallrath, 2002, Does heterochromatin protein 1 always follow code?: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 99 Suppl 4, p. 16462-16469.

Li,Z, Y Jiang, R J Ulevitch, J Han, 1996, The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 228, p. 334-340.

Lin,A, 2003, Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis: *Bioessays*, v. 25, p. 17-24.

Loo,DT, A Copani, C J Pike, E R Whitemore, A J Walencewicz, C W Cotman, 1993, Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 90, p. 7951-7955.

Lorenz,JM, D E Wooliever, J R Jetton, N Paneth, 1998, A quantitative review of mortality and developmental disability in extremely premature newborns: *Arch.Pediatr.Adolesc.Med.*, v. 152, p. 425-435.

Lue,LF, Y M Kuo, A E Roher, L Brachova, Y Shen, L Sue, T Beach, J H Kurth, R E Rydel, J Rogers, 1999, Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease: *Am.J.Pathol.*, v. 155, p. 853-862.

Lunkes,A, J L Mandel, 1997, Polyglutamines, nuclear inclusions and neurodegeneration: *Nat.Med.*, v. 3, p. 1201-1202.

Lustbader,JW, M Cirilli, C Lin, H W Xu, K Takuma, N Wang, C Caspersen, X Chen, S Pollak, M Chaney, F Trinchese, S Liu, F Gunn-Moore, L F Lue, D G Walker, P Kuppusamy, Z L Zewier, O Arancio, D Stern, S S Yan, H Wu, 2004, ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease: *Science*, v. 304, p. 448-452.

Mahley,RW, 1988, Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology: *Science*, v. 240, p. 622-630.

Manji,HK, G J Moore, G Chen, 2000, Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness: *J Clin.Psychiatry*, v. 61 Suppl 9:82-96, p. 82-96.

Mann,DM, 1988, Alzheimer's disease and Down's syndrome: *Histopathology*, v. 13, p. 125-137.

Martin,DP, R E Schmidt, P S DiStefano, O H Lowry, J G Carter, E M Johnson, Jr., 1988, Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation: *J.Cell Biol.*, v. 106, p. 829-844.

Martin,JB, 1999, Molecular basis of the neurodegenerative disorders: *N.Engl.J.Med.*, v. 340, p. 1970-1980.

Masliah,E, M Mallory, M Alford, R Deteresa, L A Hansen, D W McKeel, Jr., J C Morris, 2001, Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease: *Neurology.*, v. 56, p. 127-129.

Masters,CL, G Simms, N A Weinman, G Multhaup, B L McDonald, K Beyreuther, 1985, Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 82, p. 4245-4249.

McLean,CA, R A Cherny, F W Fraser, S J Fuller, M J Smith, K Beyreuther, A I Bush, C L Masters, 1999, Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease: *Ann.Neurol.*, v. 46, p. 860-866.

Meier,P, A Finch, G Evan, 2000, Apoptosis in development: *Nature*, v. 407, p. 796-801.

Miller,TM, E M Johnson, 1996, Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum- deprived rat cerebellar granule cells: *J.Neurosci.*, v. 16, p. 7487-7495.

Minden,A, A Lin, M McMahan, C Lange-Carter, B Derijard, R J Davis, G L Johnson, M Karin, 1994, Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK: *Science*, v. 266, p. 1719-1723.

Miyashita,T, J Matsui, Y Ohtsuka, U Mami, S Fujishima, Y Okamura-Oho, T Inoue, M Yamada, 1999, Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 257, p. 724-730.

Morishima,Y, Y Gotoh, J Zieg, T Barrett, H Takano, R Flavell, R J Davis, Y Shirasaki, M E Greenberg, 2001, Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand: *J.Neurosci.*, v. 21, p. 7551-7560.

Mortensen,RF, 1994, Macrophages and acute-phase proteins: *Immunol.Ser.*, v. 60, p. 143-158.

Mudher,A, S Lovestone, 2002, Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?: *Trends Neurosci.*, v. 25, p. 22-26.

Muyllaert,D, A Kremer, T Jaworski, P Borghgraef, H Devijver, S Croes, I Dewachter, F Van Leuven, 2008, Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and tau pathology?: *Genes Brain Behav.*, v. 7 Suppl 1, p. 57-66.

Muzio,M, A M Chinnaiyan, F C Kischkel, K O'Rourke, A Shevchenko, J Ni, C Scaffidi, J D Bretz, M Zhang, R Gentz, M Mann, P H Krammer, M E Peter, V M Dixit, 1996, FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex: *Cell*, v. 85, p. 817-827.

Myers,A, P Holmans, H Marshall, J Kwon, D Meyer, D Ramic, S Shears, J Booth, F W DeVrieze, R Crook, M Hamshere, R Abraham, N Tunstall, F Rice, S Carty, S Lillystone, P Kehoe, V Rudrasingham, L Jones, S Lovestone, J Perez-Tur, J Williams, M J Owen, J Hardy, A M Goate, 2000, Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10: *Science*, v. 290, p. 2304-2305.

Nardi,N, G Avidan, D Daily, R Zilkhafalb, A Barzilai, 1997, Biochemical and temporal analysis of events associated with apoptosis induced by lowering the extracellular potassium concentration in mouse cerebellar granule neurons: *Journal of Neurochemistry*, v. 68, p. 750-759.

Northington,FJ, D M Ferriero, D L Flock, L J Martin, 2001a, Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis: *J.Neurosci.*, v. 21, p. 1931-1938.

Northington,FJ, D M Ferriero, E M Graham, R J Traystman, L J Martin, 2001b, Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis: *Neurobiol.Dis.*, v. 8, p. 207-219.

O'Brien,R, D Xu, R Mi, X Tang, C Hopf, P Worley, 2002, Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synapses in cultured spinal neurons: *J Neurosci.*, v. 22, p. 4487-4498.

O'Brien,RJ, D Xu, R S Petralia, O Steward, R L Huganir, P Worley, 1999, Synaptic clustering of AMPA receptors by the extracellular immediate- early gene product Narp [In Process Citation]: *Neuron*, v. 23, p. 309-323.

Oddo,S, A Caccamo, J D Shepherd, M P Murphy, T E Golde, R Kaye, R Metherate, M P Mattson, Y Akbari, F M LaFerla, 2003, Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction: *Neuron*, v. 39, p. 409-421.

Olson,JM, K A Goddard, D M Dudek, 2001, The amyloid precursor protein locus and very-late-onset Alzheimer disease: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 69, p. 895-899.

Ona,VO, M Li, J P Vonsattel, L J Andrews, S Q Khan, W M Chung, A S Frey, A S Menon, X J Li, P E Stieg, J Yuan, J B Penney, A B Young, J H Cha, R M Friedlander, 1999, Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease: *Nature*, v. 399, p. 263-267.

Oppenheim,RW, 1991, Cell death during development of the nervous system: *Annu.Rev.Neurosci.*, v. 14, p. 453-501.

Osmand,AP, B Friedenson, H Gewurz, R H Painter, T Hofmann, E Shelton, 1977, Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins): *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 74, p. 739-743.

Palop,JJ, J Chin, N Bien-Ly, C Massaro, B Z Yeung, G Q Yu, L Mucke, 2005, Vulnerability of dentate granule cells to disruption of arc expression in human amyloid precursor protein transgenic mice: *J.Neurosci.*, v. 25, p. 9686-9693.

Palop,JJ, J Chin, E D Roberson, J Wang, M T Thwin, N Bien-Ly, J Yoo, K O Ho, G Q Yu, A Kreitzer, S Finkbeiner, J L Noebels, L Mucke, 2007, Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease: *Neuron*, v. 55, p. 697-711.

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

Pasinelli,P, D R Borchelt, M K Houseweart, D W Cleveland, R H Brown, Jr., 1998, Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, p. 15763-15768.

Pei,JJ, T Tanaka, Y C Tung, E Braak, K Iqbal, I Grundke-Iqbal, 1997, Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain: *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, v. 56, p. 70-78.

Peters,A, D L Rosene, 2003, In aging, is it gray or white?: *J.Comp Neurol.*, v. 462, p. 139-143.

Pike,CJ, A J Walencewicz, C G Glabe, C W Cotman, 1991, In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity: *Brain Res.*, v. 563, p. 311-314.

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

Portera-Cailliau,C, J C Hedreen, D L Price, V E Koliatsos, 1995, Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models: *J Neurosci*, v. 15, p. 3775-3787.

Porteracailliau,C, D L Price, L J Martin, 1997, 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.*, v. 378, p. 88-104.

Przedborski,S, M Vila, V Jackson-Lewis, 2003, Neurodegeneration: what is it and where are we?: *J.Clin.Invest*, v. 111, p. 3-10.

Raff,MC, B A Barres, J F Burne, H S Coles, Y Ishizaki, M D Jacobson, 1993, Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system: *Science*, v. 262, p. 695-700.

Ray,LB, T W Sturgill, 1988, Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 85, p. 3753-3757.

Reti,IM, R Reddy, P F Worley, J M Baraban, 2002, Prominent Narp expression in projection pathways and terminal fields: *J Neurochem.*, v. 82, p. 935-944.

Reti,IM, R Reddy, P F Worley, J M Baraban, 2002, Selective expression of Narp, a secreted neuronal pentraxin, in orexin neurons: *J Neurochem.*, v. 82, p. 1561-1565.

Rigamonti,D, S Sipione, D Goffredo, C Zuccato, E Fossale, E Cattaneo, 2001, Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 14545-14548.

Rodrigues,CM, S Sola, M A Brito, C D Brondino, D Brites, J J Moura, 2001, Amyloid beta-peptide disrupts mitochondrial membrane lipid and protein structure: protective role of tauroursodeoxycholate: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 281, p. 468-474.

Roher,AE, M O Chaney, Y M Kuo, S D Webster, W B Stine, L J Haverkamp, A S Woods, R J Cotter, J M Tuohy, G A Krafft, B S Bonnell, M R Emmerling, 1996, Morphology and toxicity of A β (1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease: *J.Biol.Chem.*, v. 271, p. 20631-20635.

Rohn,TT, E Head, W H Nesse, C W Cotman, D H Cribbs, 2001, Activation of caspase-8 in the Alzheimer's disease brain: *Neurobiol.Dis.*, v. 8, p. 1006-1016.

Rohn,TT, R A Rissman, M C Davis, Y E Kim, C W Cotman, E Head, 2002, Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain: *Neurobiol.Dis.*, v. 11, p. 341-354.

Ronn,LC, I Ralets, B P Hartz, M Bech, A Berezin, V Berezin, A Moller, E Bock, 2000, A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles: *J Neurosci.Methods*, v. 100, p. 25-32.

Rosen,DR, 1993, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis: *Nature*, v. 364, p. 362.

Rub,U, K Del Tredici, C Schultz, D R Thal, E Braak, H Braak, 2001, The autonomic higher order processing nuclei of the lower brain stem are among the early targets of the Alzheimer's disease-related cytoskeletal pathology: *Acta Neuropathol.*, v. 101, p. 555-564.

Rudolph,JG, J J Lemasters, F T Crews, 1997, Use of a multiwell fluorescence scanner with propidium iodide to assess NMDA mediated excitotoxicity in rat cortical neuronal cultures: *Neuroscience Letters*, v. 221, p. 149-152.

Rumpel,S, J LeDoux, A Zador, R Malinow, 2005, Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning: *Science*, v. 308, p. 83-88.

Sanchez,I, C J Xu, P Joo, A Kakizaka, J Blenis, J Yuan, 1999, Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats: *Neuron*, v. 22, p. 623-633.

Saunders,AM, W J Strittmatter, D Schmechel, P H George-Hyslop, M A Pericak-Vance, S H Joo, B L Rosi, J F Gusella, D R Crapper-MacLachlan, M J Alberts, ., 1993, Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease: *Neurology*, v. 43, p. 1467-1472.

Scherzinger,E, R Lurz, M Turmaine, L Mangiarini, B Hollenbach, R Hasenbank, G P Bates, S W Davies, H Lehrach, E E Wanker, 1997, Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo: *Cell*, v. 90, p. 549-558.

Schlimgen,AK, J A Helms, H Vogel, M S Perin, 1995, Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system: *Neuron*, v. 14, p. 519-526.

Schweichel,JU, H J Merker, 1973, The morphology of various types of cell death in prenatal tissues: *Teratology*, v. 7, p. 253-266.

Seery,LT, D R Schoenberg, S Barbaux, P M Sharp, A S Whitehead, 1993, Identification of a novel member of the pentraxin family in *Xenopus laevis*: *Proc.Biol.Sci.*, v. 253, p. 263-270.

Selkoe,DJ, 2001, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy: *Physiol Rev.*, v. 81, p. 741-766.

Selkoe,DJ, 2002, Alzheimer's disease is a synaptic failure: *Science*, v. 298, p. 789-791.

Selkoe,DJ, 2004, Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases: *Nat.Cell Biol.*, v. 6, p. 1054-1061.

Selkoe,DJ, 2008, Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior: *Behav.Brain Res.*

Selkoe,DJ, C R Abraham, M B Podlisny, L K Duffy, 1986, Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease: *Journal of Neurochemistry*, v. 46, p. 1820-1834.

Shankar,GM, B L Bloodgood, M Townsend, D M Walsh, D J Selkoe, B L Sabatini, 2007, Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway: *J.Neurosci.*, v. 27, p. 2866-2875.

Sherrington,R, E I Rogaev, Y Liang, E A Rogaeva, G Levesque, M Ikeda, H Chi, C Lin, G Li, K Holman, ., 1995, Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease: *Nature*, v. 375, p. 754-760.

Shoji,M, T E Golde, J Ghiso, T T Cheung, S Estus, L M Shaffer, X D Cai, D M McKay, R Tintner, B Frangione, ., 1992, Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing: *Science*, v. 258, p. 126-129.

Sia,GM, J C Beique, G Rumbaugh, R Cho, P F Worley, R L Huganir, 2007, Interaction of the N-terminal domain of the AMPA receptor GluR4 subunit with the neuronal pentraxin NP1 mediates GluR4 synaptic recruitment: *Neuron*, v. 55, p. 87-102.

Snyder,EM, Y Nong, C G Almeida, S Paul, T Moran, E Y Choi, A C Nairn, M W Salter, P J Lombroso, G K Gouras, P Greengard, 2005, Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta: *Nat.Neurosci.*, v. 8, p. 1051-1058.

Stadelmann,C, T L Deckwerth, A Srinivasan, C Bancher, W Bruck, K Jellinger, H Lassmann, 1999, Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death: *Am.J.Pathol.*, v. 155, p. 1459-1466.

Steel,DM, A S Whitehead, 1994, The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein: *Immunol.Today*, v. 15, p. 81-88.

Stepanek,L, Q L Sun, J Wang, C Wang, J L Bixby, 2001, CRYP-2/cPTPRO is a neurite inhibitory repulsive guidance cue for retinal neurons in vitro: *J.Cell Biol.*, v. 154, p. 867-878.

Strittmatter,WJ, A M Saunders, D Schmechel, M Pericak-Vance, J Enghild, G S Salvesen, A D Roses, 1993, Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 90, p. 1977-1981.

Sturchler-Pierrat,C, D Abramowski, M Duke, K H Wiederhold, C Mistl, S Rothacher, B Ledermann, K Burki, P Frey, P A Paganetti, C Waridel, M E Calhoun, M Jucker, A Probst, M Staufenbiel, B Sommer, 1997, Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 94, p. 13287-13292.

Syntichaki,P, K Xu, M Driscoll, N Tavernarakis, 2002, Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*: *Nature*, v. 419, p. 939-944.

Takahashi,RH, C G Almeida, P F Kearney, F Yu, M T Lin, T A Milner, G K Gouras, 2004, Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain: *J.Neurosci.*, v. 24, p. 3592-3599.

Takashima,A, T Honda, K Yasutake, G Michel, O Murayama, M Murayama, K Ishiguro, H Yamaguchi, 1998, Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons: *Neurosci.Res.*, v. 31, p. 317-323.

Takashima,A, K Noguchi, K Sato, T Hoshino, K Imahori, 1993, Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 90, p. 7789-7793.

Takuma,K, J Yao, J Huang, H Xu, X Chen, J Luddy, A C Trillat, D M Stern, O Arancio, S S Yan, 2005, ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction: *FASEB J.*, v. 19, p. 597-598.

Tanaka,T, H Saito, N Matsuki, 1996, Intracellular calcium oscillation in cultured rat hippocampal neurons: a model for glutamatergic neurotransmission: *Jpn.J.Pharmacol.*, v. 70, p. 89-93.

Tanzi,RE, L Bertram, 2005, Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective: *Cell*, v. 120, p. 545-555.

Tartaglia,LA, T M Ayres, G H Wong, D V Goeddel, 1993, A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death: *Cell*, v. 74, p. 845-853.

Tessier-Lavigne,M, C S Goodman, 1996, The molecular biology of axon guidance: *Science*, v. 274, p. 1123-1133.

Thoenen,H, 1995, Neurotrophins and neuronal plasticity: *Science*, v. 270, p. 593-598.

Thornberry,NA, Y Lazebnik, 1998, Caspases: enemies within: *Science*, v. 281, p. 1312-1316.

Thornberry,NA, T A Rano, E P Peterson, D M Rasper, T Timkey, M Garcia-Calvo, V M Houtzager, P A Nordstrom, S Roy, J P Vaillancourt, K T Chapman, D W Nicholson, 1997, A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family

and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 17907-17911.

Tokuda,T, T Fukushima, S Ikeda, Y Sekijima, S Shoji, N Yanagisawa, A Tamaoka, 1997, Plasma levels of amyloid beta proteins Abeta1-40 and Abeta1-42(43) are elevated in Down's syndrome: *Ann.Neurol.*, v. 41, p. 271-273.

Tournier,C, C Dong, T K Turner, S N Jones, R A Flavell, R J Davis, 2001, MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines: *Genes Dev.*, v. 15, p. 1419-1426.

Tournier,C, P Hess, D D Yang, J Xu, T K Turner, A Nimnual, D Bar-Sagi, S N Jones, R A Flavell, R J Davis, 2000, Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway: *Science*, v. 288, p. 870-874.

Tournier,C, A J Whitmarsh, J Cavanagh, T Barrett, R J Davis, 1999, The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases: *Mol.Cell Biol.*, v. 19, p. 1569-1581.

Tsui,CC, N G Copeland, D J Gilbert, N A Jenkins, C Barnes, P F Worley, 1996, Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity: *J.Neurosci.*, v. 16, p. 2463-2478.

Tuffereau,C, J Benejean, D Blondel, B Kieffer, A Flamand, 1998, Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus: *EMBO J.*, v. 17, p. 7250-7259.

Turmaine,M, A Raza, A Mahal, L Mangiarini, G P Bates, S W Davies, 2000, Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 97, p. 8093-8097.

Vaillant,AR, I Mazzoni, C Tudan, M Boudreau, D R Kaplan, F D Miller, 1999, Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival: *J.Cell Biol.*, v. 146, p. 955-966.

Vila,M, S Przedborski, 2003, Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases: *Nat.Rev.Neurosci.*, v. 4, p. 365-375.

Walsh,DM, I Klyubin, J V Fadeeva, W K Cullen, R Anwyl, M S Wolfe, M J Rowan, D J Selkoe, 2002, Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo: *Nature*, v. 416, p. 535-539.

Walsh,DM, D J Selkoe, 2004, Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease: *Neuron*, v. 44, p. 181-193.

Walsh,DM, D J Selkoe, 2007, A beta oligomers - a decade of discovery: *Journal of Neurochemistry*, v. 101, p. 1172-1184.

Wang,XS, K Diener, C L Manthey, S Wang, B Rosenzweig, J Bray, J Delaney, C N Cole, P Y Chan-Hui, N Mantlo, H S Lichenstein, M Zukowski, Z Yao, 1997, Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 23668-23674.

Watson,A, A Eilers, D Lallemand, J Kyriakis, L L Rubin, J Ham, 1998, Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons: *J.Neurosci.*, v. 18, p. 751-762.

Wei,H, P R Leeds, Y Qian, W Wei, R Chen, D Chuang, 2000, beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment: *Eur.J.Pharmacol.*, v. 392, p. 117-123.

Wei,W, X Wang, J W Kusiak, 2002, Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection: *J Biol.Chem.*, v. 277, p. 17649-17656.

Westbrook-Case,VA, V P Winfrey, G E Olson, 1994, A domain-specific 50-kilodalton structural protein of the acrosomal matrix is processed and released during the acrosome reaction in the guinea pig: *Biol.Reprod.*, v. 51, p. 1-13.

Weston,CR, R J Davis, 2002, The JNK signal transduction pathway: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 12, p. 14-21.

White,AR, R Reyes, J F Mercer, J Camakaris, H Zheng, A I Bush, G Multhaup, K Beyreuther, C L Masters, R Cappai, 1999, Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice: *Brain Res.*, v. 842, p. 439-444.

Whitehouse,PJ, D L Price, R G Struble, A W Clark, J T Coyle, M R DeLong, 1982, Alzheimer's disease and senile dementia; loss of neurons in the basal forebrain: *Science*, v. 215, p. 1237-1239.

Whitmarsh,AJ, J Cavanagh, C Tournier, J Yasuda, R J Davis, 1998, A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation: *Science*, v. 281, p. 1671-1674.

Wiznerowicz,M, D Trono, 2003, Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference: *J.Virol.*, v. 77, p. 8957-8961.

Wiznerowicz,M, D Trono, 2005, Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology: *Trends Biotechnol.*, v. 23, p. 42-47.

Woodgett,JR, 1990, Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A: *EMBO J.*, v. 9, p. 2431-2438.

Woodgett,JR, 1991, cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3: *Methods Enzymol.*, v. 200, p. 564-577.

Woodgett,JR, 2001, Judging a protein by more than its name: GSK-3: *Sci.STKE.*, v. 2001, p. RE12.

Worley,PF, R V Bhat, J M Baraban, C A Erickson, B L Mcnaughton, C A Barnes, 1993, Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement: *J.Neurosci.*, v. 13, p. 4776-4786.

Worley,PF, A J Cole, T H Murphy, B A Christy, Y Nakabeppu, J M Baraban, 1990, Synaptic Regulation of Immediate-Early Genes in Brain: *Cold Spring Harbor Symp.Quant.*, v. 55, p. 213-223.

Xia,Z, M Dickens, J Raingeaud, R J Davis, M E Greenberg, 1995, Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis: *Science*, v. 270, p. 1326-1331.

Xu,D, C Hopf, R Reddy, R W Cho, L Guo, A Lanahan, R S Petralia, R J Wenthold, R J O'Brien, P Worley, 2003, Narp and NP1 form heterocomplexes that function in developmental and activity-dependent synaptic plasticity: *Neuron*, v. 39, p. 513-528.

Yamada,M, H Ohnishi, S Sano, A Nakatani, T Ikeuchi, H Hatanaka, 1997, Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 30334-30339.

Yamagishi,S, M Yamada, Y Ishikawa, T Matsumoto, T Ikeuchi, H Hatanaka, 2001, p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons: *J Biol.Chem.*, v. 276, p. 5129-5133.

Yang,DD, C Y Kuan, A J Whitmarsh, M Rincon, T S Zheng, R J Davis, P Rakic, R A Flavell, 1997, Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene: *Nature*, v. 389, p. 865-870.

Yankner,BA, L K Duffy, D A Kirschner, 1990, Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides: *Science*, v. 250, p. 279-282.

Yasojima,K, C Schwab, E G McGeer, P L Mcgeer, 2000, Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease: *Brain Res.*, v. 887, p. 80-89.

Yin,KJ, J M Lee, S D Chen, J Xu, C Y Hsu, 2002, Amyloid-beta induces Smac release via AP-1/Bim activation in cerebral endothelial cells: *J.Neurosci.*, v. 22, p. 9764-9770.

Yonehara,S, A Ishii, M Yonehara, 1989, A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor: *J.Exp.Med.*, v. 169, p. 1747-1756.

Yoon,SO, P Casaccia-Bonofil, B Carter, M V Chao, 1998, Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival: *J.Neurosci.*, v. 18, p. 3273-3281.

Yu,SW, H Wang, M F Poitras, C Coombs, W J Bowers, H J Federoff, G G Poirier, T M Dawson, V L Dawson, 2002, Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor: *Science*, v. 297, p. 259-263.

Yuan,J, M Lipinski, A Degtrev, 2003, Diversity in the mechanisms of neuronal cell death: *Neuron*, v. 40, p. 401-413.

Yuan,J, S Shaham, S Ledoux, H M Ellis, H R Horvitz, 1993, The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme: *Cell*, v. 75, p. 641-652.

Yuan,J, B A Yankner, 2000, Apoptosis in the nervous system: *Nature*, v. 407, p. 802-809.

Zahedi,K, R F Mortensen, 1986, Macrophage tumoricidal activity induced by human C-reactive protein: *Cancer Res.*, v. 46, p. 5077-5083.

Zhang,CL, Y Zou, W He, F H Gage, R M Evans, 2008, A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour: *Nature*, v. 451, p. 1004-1007.

Zhao,C, W Deng, F H Gage, 2008, Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis: *Cell.*, v. 132, p. 645-660.

Zhao,L, Q L Ma, F Calon, M E Harris-White, F Yang, G P Lim, T Morihara, O J Ubeda, S Ambegaokar, J E Hansen, R H Weisbart, B Teter, S A Frautschy, G M Cole, 2006, Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease: *Nat.Neurosci.*, v. 9, p. 234-242.

Zufferey,R, T Dull, R J Mandel, A Bukovsky, D Quiroz, L Naldini, D Trono, 1998, Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery: *J.Virol.*, v. 72, p. 9873-9880.