



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**Papel del estrés oxidante en el metabolismo amiloidogénico  
y toxicidad de la proteína  $\beta$ -amiloide. Implicaciones en la  
Enfermedad de Alzheimer.**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:  
Doctor en Ciencias**

**Presenta**

**LIBB. Ricardo David Quiroz Baez**



Directora de tesis:

Dra. Ana Clorinda Arias Alvarez



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Somos la memoria que tenemos y la responsabilidad que asumimos. Sin la memoria no existimos, sin la responsabilidad quizá no debamos existir.

- José Saramago -

**A mis papás y a Mauricio, por su amor incondicional.**

**A Karina, por ser mi cómplice en este camino que hemos recorrido juntos**

A Clorinda por su apoyo, guía, confianza e infinita paciencia durante todo este tiempo. Así como su invaluable contribución en mi formación académica

A todos los amigos, a los que estuvieron y sobre todo a los que siguen estando:  
A los Pedicanos, al conclave, a los logoitos y biomédicos.

A Patricia Ferrera por su apoyo técnico y sus pláticas mañaneras.

Agradecimientos especiales:

Al Dr. Ricardo Tapia y al Dr. Luis Vaca, miembros de mi comité tutorial. Por su constante supervisión a lo largo de este tiempo.

A la Dra. Teresa Corona, a la Dra. Mahara Valverde, al Dr. Rolando Hernández y al Dr. José Pedraza, por su disposición en la revisión de esta tesis y las observaciones hechas para mejorarla.

A la DGEP y al CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Y especialmente a la **UNAM** por todo lo que he recibido de ella y espero retribuirle.

Este proyecto se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con el apoyo económico del PAPIIT (IN217806) y el CONACyT (48663).

---

# ÍNDICE

---

I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	9
III. INTRODUCCIÓN	10
IV. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	11
IV.1 MODELOS EXPERIMENTALES DE LA EA	13
IV.2 HIPÓTESIS DEL AMILOIDE EN LA EA	14
IV.3 PROTEÍNA $\beta$ -AMILOIDE	15
V. PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE	17
V.1 METABOLISMO DE LA PPA	18
V.2 FOSFORILACIÓN DE LA PPA	20
V.3 CONDICIONES QUE PROPICIAN LA GENERACIÓN DE FRAGMENTOS AMILOIDOGÉNICOS	21
VI. ESTRÉS OXIDANTE Y LA EA	22
VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
VIII. HIPÓTESIS	25
IX. OBJETIVOS	25
X. MÉTODOS	26
X.1 CULTIVOS DE NEUROBLASTOMA HUMANO	26
X.2 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR	26
X.3 CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	27
X.4 EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE $A\beta_{42}$ POR ENSAYO DE ELISA	28

<b>X.5 ELECTROFORESIS E INMUNOBLOT</b>	<b>28</b>
<b>X.6 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA</b>	<b>30</b>
<b>X.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>31</b>
<b>XI. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>XII. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>XIII. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>51</b>
<b>XIV. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>
<b>XV. ARTÍCULO DERIVADO DEL PROYECTO DE TESIS</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>A<math>\beta</math></b>	Proteína $\beta$ -amiloide
<b>PPA</b>	Proteína precursora del amiloide
<b>ADAM</b>	Familia de desintegrinas y metaloproteasa (por sus siglas en ingles)
<b>TACE</b>	Enzima convertidora de TNF- $\alpha$ (por sus siglas en ingles)
<b>BACE</b>	Enzima degradadora de A $\beta$ (por sus siglas en ingles)
<b>PS</b>	Presenilina
<b>JNK</b>	Cinasa N-terminal de c-jun (por sus siglas en ingles)
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>MTT</b>	3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazodio
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>FeCl<sub>2</sub></b>	Cloruro ferroso
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de cobre
<b>kDa</b>	Kilo dalton

## I. RESUMEN

---

La etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer (EA) es compleja y se han involucrado múltiples factores en su origen, sin embargo parece claro que un evento central ocurre a partir del procesamiento alterado de la proteína precursora del amiloide (PPA) que resulta en la sobreproducción y agregación de formas neurotóxicas de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Más allá de los casos de origen familiar de la EA, en donde las mutaciones encontradas se relacionan con una sobreproducción de la  $A\beta$ , poco se conoce acerca de los mecanismos involucrados en los casos de tipo esporádico, los cuales representan casi la totalidad (95%) de los enfermos con EA. Por otro lado, abundante información, proveniente de pacientes y modelos animales, indica que el estrés oxidante es uno de los factores capitales y más frecuentemente asociados con esta enfermedad neurodegenerativa. En este sentido, el interés del presente estudio fue explorar el efecto del estrés oxidante sobre el metabolismo de la PPA silvestre, expresada de manera basal en neuronas diferenciadas de neuroblastoma humano, lo cual representa un modelo fisiológico más cercano a la generación neuronal de  $A\beta$  bajo condiciones patológicas. Debido a que el  $H_2O_2$  es la principal fuente natural del radical hidroxilo en el cerebro y que el  $FeCl_2$  es capaz de promover un estado de estrés oxidante incluyendo la generación del radical hidroxilo a partir del  $H_2O_2$ , en el presente trabajo decidimos estudiar el efecto de estas moléculas pro-oxidantes sobre los niveles de PPA y su procesamiento por parte de las enzimas  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, así como el papel de la proteína N-terminal c-jun cinasa (JNK) involucrada en vías de señalización activadas por estrés. Nuestros resultados aportan evidencias de la modulación dual en el metabolismo de la PPA, relacionado con una regulación negativa de proteínas con actividad de  $\alpha$ -secretasa, así como una regulación positiva de componentes de la  $\gamma$ - y  $\beta$ -secretasa. Además, encontramos que un evento central en la generación exacerbada de  $A\beta$  es la fosforilación del residuo de Thr668 de la PPA por la enzima JNK.

En conjunto, estos resultados aportan evidencia de que condiciones pro-oxidantes en el ambiente neuronal propician la generación de  $A\beta$  y permiten proponer el desarrollo y utilización de fármacos que tengan como blanco la modulación de enzimas proteolíticas de la PPA y algunas cinasas activadas por estrés celular.



---

## II. ABSTRACT

---

The pathogenesis of Alzheimer disease (AD) is complex and is certain to involve diverse etiological factors, but a central role has been strongly suggested for amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ), based on genetic, biochemical and neurotoxicological evidence. In contrast with the well-documented effect of genetic mutations in  $A\beta$  overproduction, not much is known about the mechanisms involved in sporadic AD (SAD) which account for more than 95% of cases. Extensive data from patients and in vivo animal models indicate that oxidative stress is one of the cardinal factors most frequently associated with this neurodegenerative disease. The aim of the present study was to explore the effect of oxidative stress on the normally expressed wild-type amyloid precursor protein (PPA) in human neuroblastoma cells, which represents a more physiological model of neuronal  $A\beta$  generation. Since  $H_2O_2$  is the main source of the highly reactive hydroxyl radical in the brain, and  $FeCl_2$  can stimulate oxidative stress, including the formation of the hydroxyl radical from  $H_2O_2$ , in the present work we studied the effect of these two prooxidant molecules on the levels and processing of human PPA by  $\alpha$ -,  $\beta$ -  $\gamma$ - secretase, and the role of the stress-activated kinase c-jun N-terminal kinase (JNK). We provide evidence for a dual modulation of amyloid precursor protein metabolism in differentiated human neuroblastoma cells related with a down-regulation of  $\alpha$ -secretase and up-regulation of  $\gamma$ -secretase, and particularly of  $\beta$ -secretase and also a JNK depending  $A\beta$  generation.

---

### III. INTRODUCCIÓN

---

Conforme la expectativa de vida aumenta un número cada vez mayor de individuos presentan padecimientos neurodegenerativos, que se caracterizan por ser crónicos y progresivos, los cuales culminan con la muerte del sujeto. La neurodegeneración es un proceso cuya aparición depende principalmente del estado general del individuo, que se da con mayor o menor velocidad tomando en cuenta la predisposición genética, las características particulares del metabolismo así como los factores externos imperantes. Las características clínicas de estos padecimientos están dadas por las poblaciones neuronales que se vean afectadas, aunque en la mayoría de los casos derivan en el desarrollo de una demencia. Esta se define como la pérdida o disminución de las habilidades de memoria y cognición. Diferentes tipos de demencias se asocian a síntomas y patrones histológicos específicos.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un problema de salud pública que afecta aproximadamente al 2% de la población en países industrializados y de manera dramática a las personas mayores de 70 años. Algunas proyecciones epidemiológicas apuntan que para el 2040, 71% de los 81 millones de casos de demencia se encontraran en países en desarrollo, como el nuestro. En el año 2004 la Secretaría de Salud reportó 360 mil casos en México. Hasta el momento no hay medidas curativas ni preventivas eficaces. Sin embargo, se ha señalado que la dieta y el estilo de vida pueden influir en el riesgo de padecer EA y algunos estudios sugieren que aquellas condiciones que afectan al sistema vascular como la hipertensión, la diabetes de tipo 2 y la obesidad, incrementan importantemente este riesgo. La EA es uno de los padecimientos que causa mayor incapacidad individual y que impacta enormemente en el ambiente familiar y social.

---

#### IV. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

---

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una demencia neurodegenerativa progresiva, la cual se asocia al envejecimiento. La prevalencia de esta enfermedad es del 3% en individuos entre 60 y 70 años, alcanzando un 40% en personas mayores de 85 años (Hebert *et al.*, 2003). En el año de 1906 el médico alemán Alois Alzheimer realizó la primer descripción clínica y neuropatológica de un tipo de demencia senil, la cual se presentó en una mujer de 51, Auguste D, quién murió después de 4 años de padecimiento (Alzheimer, 1907). Después de casi 30 años se realizó la descripción del primer caso autosómico dominante (para revisión ver Hardy, 2006). Posteriormente se descifró en estas familias que el gen implicado se encontraba en el cromosoma 14 y codificaba para una proteína mutada nombrada presenilina (van Broeckhoven *et al.*, 1992).

Clínicamente los síntomas característicos de la EA se han dividido en tres etapas dependiendo del progreso de la enfermedad. En la primera se presenta una pérdida en la memoria a corto plazo y desorientación espacio-temporal. En la segunda se presentan los primeros síntomas no cognoscitivos (cambios en la personalidad, ansiedad, tensión, irritabilidad, apatía, etc.), una afectación generalizada de la memoria, diafasias, pérdida del juicio y del pensamiento abstracto. En la última etapa, hay un aumento del tono muscular, el deterioro cognoscitivo es tal que el individuo es incapaz de reconocer a sus familiares e incluso a si mismo hasta que pierde todo contacto consciente con el mundo. El control de algunas funciones corporales (regulación de esfínteres) desaparece, por lo que en este momento el individuo presenta una dependencia total. Desde el inicio de la enfermedad hasta la muerte del individuo pueden transcurrir de 12 a 20 años (para revisión ver Arias, 1999).

A nivel histopatológico, este padecimiento se caracteriza por una pérdida sináptica generalizada en áreas cerebrales de alta plasticidad (evento temprano previo a la muerte neuronal), además de presentar placas amiloideas o seniles y marañas neurofibrilares. Las primeras son depósitos extraneuronales de proteína  $\beta$ -amiloide

(A $\beta$ ), las segundas son depósitos intraneuronales de proteína *tau*, la cual estabiliza los microtúbulos axonales. Aunque hasta el momento no se conocen los mecanismos por los cuales se generan estos dos rasgos histopatológicos, ambos parecieran ser un factor importante en el desencadenamiento de la muerte neuronal.

Las marañas se encuentran principalmente en el soma neuronal abarcándolo casi en su totalidad (Iqbal & Grundke-Iqbal, 1991). Las personas que padecen la EA, presentan grandes alteraciones en la estructura del citoesqueleto neuronal (Delacourte & Defossez, 1986). Como resultado de este evento, se generan estructuras conocidas como filamentos helicoidales apareados (FHA), las cuales se asocian para producir las marañas neurofibrilares (Kidd, 1963; Wisniewski *et al.*, 1976). El análisis de los FHA permitió la identificación de la proteína asociada a microtúbulos *tau* en forma de polímeros insolubles (Wischik *et al.*, 1988). *Tau* presenta 6 isoformas (Goedert *et al.*, 1989) las cuales se localizan principalmente en los axones (Binder *et al.*, 1985) participando en su elongación y estabilización (Caceres *et al.*, 1991) y siendo fundamental para las funciones neuronales ya que regula su morfología y fisiología (Knops *et al.*, 1991). Su actividad biológica se encuentra regulada por el grado de fosforilación que presenta. De manera normal *tau* posee 2-3 moles de fosfato, pero pacientes con la EA presentan una hiperfosforilación que alcanza de 10-12 moles de fosfato por mol de proteína (Alonso *et al.*, 1994; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). La hiperfosforilación de *tau* reduce su capacidad de unión a microtúbulos, además de promover su auto agregación (Alonso *et al.*, 1996). Esto conduce a un ensamblaje defectuoso de los microtúbulos y a la formación de estructuras filamentosas (marañas neurofibrilares) que afectan el flujo axoplásmico, la morfología y el funcionamiento normal de las neuronas favoreciendo la neurodegeneración (Davies, 1994).

Las placas seniles están conformadas por un núcleo compuesto principalmente por A $\beta_{42}$  rodeadas por neuritas distróficas y procesos de células gliales reactivas, estas se observan más frecuentemente en la amígdala, el hipocampo y la neocorteza (para revisión ver Arias, 1999). Otras proteínas que también han sido identificadas son la  $\alpha_1$ -antiquimotripsina (Abraham *et al.*, 1988), la apolipoproteína E (Namba *et al.*, 1991),

proteasas lisosomales (Cataldo & Nixon, 1992) y enzimas antioxidantes (Pappolla *et al.*, 1992), aunque se desconoce si tienen participación en la formación de la placa o simplemente son absorbidas por ésta. Adicionalmente, se han detectado proteoglicanos de heparan sulfato, los cuales podrían participar en la formación de fibrillas amiloideas (Snow *et al.*, 1990).

La disminución en la densidad sináptica y neuronal que sucede en este padecimiento parece ser responsable y correlaciona con la deficiencia cognoscitiva típica de la primera etapa de la EA (Carter & Liapp, 2001; Masliah *et al.*, 1991), de hecho, la pérdida de sinaptofisina se usa como un marcador temprano. La disminución en la densidad sináptica se refleja como la pérdida de la mayoría de los componentes de las vesículas sinápticas y de la mayoría de los péptidos almacenados en las mismas (Arendt, 2001). Esta pérdida sináptica, puede llegar a ser hasta de un 75% en el hipocampo (Terry & Katzman, 2000).

#### **IV.1 MODELOS EXPERIMENTALES DE LA EA**

Debido a la compleja etiología de la EA hasta el momento, no existe un modelo que presente por si mismo todas las características de la enfermedad. Sin embargo se han generado diversos modelos animales, que al menos de forma parcial, desarrollan las características conductuales y/o histopatológicas que se observan en la EA. En este sentido, los modelos se pueden subdividir en aquellos que desarrollan la patología amiloidea de forma natural con la edad y aquellos genéticamente modificados para expresar formas mutantes presentes en la EA (generalmente ratones).

Ejemplo de los primeros son el uso del chimpancé (Martin *et al.*, 1991; Rosen *et al.*, 2008) y de canes (Satou *et al.*, 1997), que de manera natural desarrollan depósitos amiloideos. A pesar de ser atractivos, tienen en su contra el hecho de que el lapso temporal para presentar estas características es muy prolongado, además de no desarrollar todas las características presentes en esta enfermedad. Debido a lo

anterior, el uso de modelos murinos transgénicos, que expresen genes con mutaciones autosómicas dominantes que se han determinado participan el desarrollo de la EA de tipo familiar, ha facilitado el estudio de los mecanismos implicados en su desarrollo. Los tres tipos de genes más utilizados por sus efectos en el progreso de la enfermedad son: el de la PPA (Goate *et al.*, 1991) y los de la Presenilina 1 y 2 (Lemere *et al.*, 1996; Levy-Lahad *et al.*, 1995). Gran parte del conocimiento que actualmente se tiene de la EA se sustenta en el estudio de las decenas de modelos transgénicos generados hasta ahora, ya sea en sus distintas variantes individuales o en combinación entre estos u otros genes relevantes en la enfermedad. Sin embargo, hasta el momento no existe un modelo que, basándose en las características presentes en la EA de tipo esporádica permita su estudio. Cabe señalar que este mismo escenario se repite de igual forma en los modelos *in vitro* desarrollados hasta el momento. Lo que hace relevante el presente estudio para el entendimiento de la enfermedad, al utilizar células de neuroblastoma humano MSN diferenciadas en neuronas, que expresan de manera basal la APP no mutada, lo cual representa un modelo fisiológico más cercano a la generación neuronal de A $\beta$  bajo condiciones patológicas

#### **IV.2 HIPÓTESIS DEL AMILOIDE EN LA EA**

Aunque este padecimiento tiene una patogénesis compleja y puede involucrar múltiples factores etiológicos, la sobreproducción de A $\beta$  parece jugar un papel central, como ha quedado demostrado por diversos estudios genéticos, histopatológicos y bioquímicos (Selkoe, 1991; Cotman *et al.*, 1992; Hsiao *et al.*, 1996; Walsh & Selkoe, 2004).

Diversos estudios han llevado a la identificación de las vías bioquímicas implicadas en la generación de A $\beta$ . Del total de casos de EA, sólo entre el 1-5% tienen un explicación genética (EAF). Estos pacientes con la EAF presentan mutaciones en el gen de la proteína precursora del amiloide (PPA) a partir de la cual se genera la A $\beta$ , así como en otras proteínas involucradas en su procesamiento, lo cual favorece la formación y

secreción de la A $\beta$ . Así mismo, modelos transgénicos, los cuales expresan la PPA humana con dichas mutaciones, exhiben parte de la patología de la enfermedad y han provisto de evidencia experimental que sustenta la correlación entre la generación de A $\beta$  y la neurodegeneración característica de la enfermedad. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual A $\beta$  causa el deterioro cognitivo, y si el grado de la demencia correlaciona con el grado de pérdida neuronal.

Los casos de la EA que no pueden ser explicados por causas genéticas, se les conoce como de tipo esporádico (EAE). Estos pacientes al igual que los EAF, presentan las mismas características patológicas, aunque las desarrollan en etapas más avanzadas de la vida. El hecho que ambos tipos de la EA presenten una sobre producción de A $\beta$ , ha llevado a postular una hipótesis amiloidea del origen de la enfermedad. Esta propone que la EA es desencadenada por un desequilibrio en la generación o acumulación de A $\beta$ , lo cual conduce al desarrollo de la misma. Aunque esta hipótesis no es capaz de explicar todos los eventos que ocurren en el transcurso de la enfermedad, está claro que el conocimiento de los procesos que llevan a la sobreproducción del A $\beta$  es fundamental en el entendimiento y el desarrollo de estrategias terapéuticas en la EA.

### **IV.3 PROTEÍNA $\beta$ -AMILOIDE**

El A $\beta$  es un péptido de 40-42 aminoácidos, que se origina a partir del corte proteolítico de la APP por la acción de la  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas (Lichtenthaler *et al.*, 1999; Seubert *et al.*, 1993; Tienari *et al.*, 1997). Aunque la mayor parte del A $\beta$  se genera en vesículas endocíticas para ser secretado posteriormente, una fracción pequeña tiene su origen en el aparato de Golgi y en menor proporción en el retículo endoplásmico. La principal forma de A $\beta$  generado es la de 40 aminoácidos (A $\beta_{40}$ ), hallada en concentraciones nanomolares en el líquido cefaloraquídeo (Vigo-Pelfrey *et al.*, 1993). Sin embargo, la forma de 42 aminoácidos (A $\beta_{42}$ ) es la más fibrogénica y se encuentra

altamente enriquecida en los núcleos de las placas seniles en paciente y modelos transgénicos de la enfermedad (Kuo *et al.*, 1996). De hecho, esta alcanza una proporción cerca al 70% del núcleo proteico que compone el peso seco de las placas seniles (Miller, 1993).

Inicialmente se postulaba la necesidad de que la A $\beta$  se encontrara en un estado agregado para ejercer sus efectos tóxicos. Sin embargo, estudios recientes señala que son formas diméricas y oligoméricas las que tienen un efecto deletéreo sobre las neuronas (Freir *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Entre estos efectos destacan: la desregulación de la homeostasis del calcio (Hartmann *et al.*, 1993; Mattson *et al.*, 1992); la generación de radicales libres y la subsecuente oxidación de lípidos de membrana y proteínas (Behl *et al.*, 1994; Buttterfield *et al.*, 1994; Smith-Swintosky *et al.*, 1995). Así mismo, la A $\beta$  es capaz de potenciar el efecto de distintos agentes tóxicos neuronales, incluyendo el producido por los aminoácidos excitadores (Behl *et al.*, 1992; Mattson *et al.*, 1992), la privación de glucosa (Copani *et al.*, 1991) y el estrés oxidante (Lockhart *et al.*, 1994; Behl *et al.*, 1997). También se ha reportado que la A $\beta$  tiene la capacidad para promover la fosforilación de la proteína Tau, en cultivos neuronales de corteza e hipocampo (Busciglio *et al.*, 1995); así como la inhibición de la LTP en el hipocampo de rata, tanto in vivo como in vitro (Freir *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).



---

## V. PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE

---

La PPA es una glicoproteína transmembranal del tipo 1 de entre 120-200 kD, integrada por 3 regiones (Kang *et al.*, 1987): un gran dominio extracelular en la región N-terminal que forma una estructura globular (Rossonjohn *et al.*, 1999); una región transmembranal, que contiene parte de la secuencia de la A $\beta$ ; y un pequeño dominio citoplasmático en la región C-terminal. Esta proteína es ubicua al organismo y muy conservada evolutivamente (Goldgaber *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987). El gen de la PPA se localiza en el cromosoma 21, y existen 10 isoformas con un tamaño que puede variar de 563 hasta 770 aminoácidos. Las neuronas principalmente expresan la isoforma PPA<sub>695</sub> (Coulson *et al.*, 2000).

En el SNC, la PPA puede funcionar como un factor neurotrófico, involucrado durante el desarrollo y la vida adulta. Entre las características celulares de la PPA se ha reportado su interacción con los microtúbulos, implicándola en el proceso de tráfico vesicular, además se ha demostrado que está sujeta a un transporte rápido hacia las terminales sinápticas y se encuentra presente en las uniones neuromusculares. Otros estudios han señalado su capacidad de interactuar con componentes de la matriz extracelular, lo que sugiere su participación en la fisiología neuronal como un receptor membranal involucrado en la adhesión celular (Ghiso *et al.*, 1992). De esta manera, la PPA podría intervenir en el mantenimiento, estabilidad y función sinápticas. En este sentido, Ninomiya (1993) demostró la participación de la PPA como un factor involucrado en el crecimiento y guía axonal durante el desarrollo. Por otra lado, dentro de la región citoplasmática de la PPA, se han identificado ciertos dominios consenso que sugieren su acción en vías de señalización (Nishimoto *et al.*, 1993; Nordstedt *et al.*, 1993), así como en la regulación de factores de transcripción (Minopoli *et al.*, 2001). En los últimos años estudios *in vitro* ha demostrado que la PPA es capaz de unir iones metálicos (Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>), y se ha postulado su intervención en la homeostasis de dichos iones en el cerebro (White *et al.*, 1999).

A nivel electrofisiológico, algunos reportes han señalado que la actividad transcripcional de la PPA se encuentra regulada positivamente durante la inducción de la LTP, y que este efecto se ve disminuido durante la vejez (Stéphan *et al.*, 2002). Otros trabajos realizados en rebanadas de hipocampo muestran que la elevación en los niveles de PPA, posterior a la estimulación eléctrica, viene acompañada de un aumento en la generación de A $\beta$  y una subsecuente inhibición de la actividad neuronal (Wang *et al.*, 2004).

### **V.1 METABOLISMO DE LA PPA**

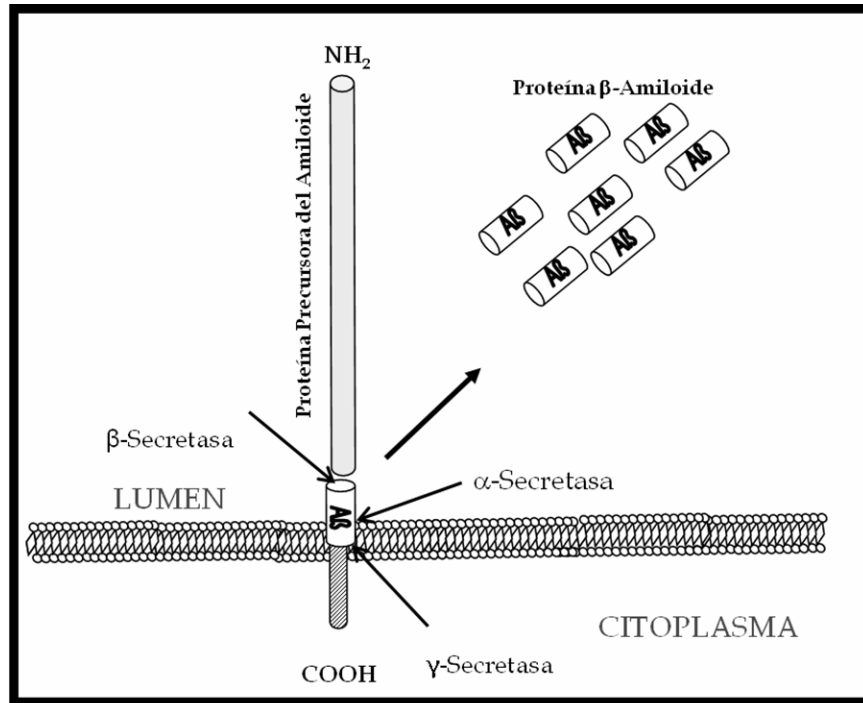
La PPA es sustrato de distintas enzimas, y dependiendo cual de ellas actúe, puede ser procesada a través de dos vías proteolíticas: la amiloidogénica y la no amiloidogénica (ver Esq. 1). En la vía amiloidogénica, la A $\beta$  es generada por el procesamiento secuencial de la  $\beta$ - y la  $\gamma$ -secretasa, las cuales producen las regiones N- y C-terminal respectivamente. Alternativamente, en la vía no amiloidogénica la PPA puede ser procesada en la membrana plasmática por la  $\alpha$ -secretasa, lo cual previene la formación de la A $\beta$  y permite la generación de un fragmento con propiedades neurotróficas ( $\alpha$ PPAs).

A pesar que el procesamiento de la PPA mediado por la  $\alpha$ -secretasa es la principal vía proteolítica, la identidad exacta de la  $\alpha$ -secretasa no ha sido confirmada; sin embargo, su actividad se ha asociado a regiones con bajo contenido de colesterol (Kojro *et al.*, 2001). Estudios farmacológicos indican que la  $\alpha$ -secretasa es una metaloproteasa dependiente de zinc (Parvhaty *et al.*, 1998). Su actividad enzimática puede ser constitutiva o inducible a través de la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Lammich *et al.*, 1999). Datos recientes sugieren que la proteína TACE (enzima convertidora del TNF- $\alpha$ ), una metaloproteasa perteneciente a la familia de proteínas ADAM (a disintegrin and metalloprotease), también nombrada ADAM17, podría presentar la actividad inducible de la  $\alpha$ -secretasa (Peschon *et al.*, 1998). Por otro lado, la proteína ADAM10 muestra actividad de  $\alpha$ -secretasa en el procesamiento de la PPA.

Así, la expresión de una forma dominante negativa de la ADAM10 es capaz de inhibir la actividad endógena de la  $\alpha$ -secretasa, mientras que la sobreexpresión de la forma silvestre de la ADAM10, incrementa tanto la actividad constitutiva como la inducible de la  $\alpha$ -secretasa (Wen *et al.*, 1997). Algunos estudios sugieren que la proteína ADAM9 podría ser otra candidata con actividad de  $\alpha$ -secretasa (Asai *et al.*, 2003).

Bajo condiciones metabólicas normales, alrededor del 10% de la PPA no es procesada por la  $\alpha$ -secretasa, entonces la PPA es internalizada por los compartimientos endocíticos y subsecuentemente procesada a través de la vía amiloidogénica (en la que participan  $\beta$ - y la  $\gamma$ -secretasa). La proteína BACE ( $\beta$ -site PPA-cleaving enzyme) ha sido identificada como la proteína que posee la actividad de  $\beta$ -secretasa; BACE es una proteína que presenta homología con la familia de las pepsinas, proteasas de aspartato (Vassar *et al.*, 1999). La proteína BACE-1 tiene altos niveles de expresión en neuronas y parece ser la principal enzima de la vía amiloidogénica (Fluhrer *et al.*, 2002). El uso de oligos antisentido dirigidos contra la proteína BACE-1 reduce la generación de la  $A\beta$  en cultivos celulares (Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Mientras que el corte proteolítico mediado por BACE-1 ocurre en el Asp-1 del dominio de la  $A\beta$ , interesantemente, la proteína homóloga BACE-2 posee una especificidad distinta en el procesamiento de la PPA. Fluhrer (2002) demostró que el corte proteolítico mediado por BACE-2 ocurre en medio del dominio de la  $A\beta$ , entre las Phe 19 y 20.

La actividad proteolítica de la otra secretasa involucrada en la vía amiloidogénica ocurre en la región transmembranal de la PPA. La  $\gamma$ -secretasa es un complejo proteico integrado por: la presenilina (PS), la cual posee la actividad proteolítica del complejo; la nicastrina; la Aph-1; y la Pen-2 (Yu *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2002). La participación de estas proteínas en el complejo es crítica para su función, ya que cada una puede modificar su actividad y respuestas a estímulos fisiológicos (Parvathy *et al.*, 1998). La participación de la PS en la patogénesis de la EA se ha demostrado en la mayoría de los casos de EA familiar, con un claro componente genético (Price & Sisodia, 1998).



Esq. 1 Participación de las distintas secretasas involucradas en el procesamiento de la PPA para la generación de la Aβ.

## V.2 FOSFORILACIÓN DE LA PPA

Existe evidencia de que la PPA es una fosfoproteína, que posee residuos fosforilables tanto en la región citoplasmática (Gandy *et al.*, 1988) como en la extracelular/luminal (Knops *et al.*, 1993). Aunque se han descrito al menos 5 sitios citoplasmáticos de fosforilación de la APP, la Thr668 (basándose la numeración en la isoforma PPA<sub>695</sub>), es un blanco exclusivo de células neuronales. A nivel fisiológico, la fosforilación de la PPA se ha reportado en neuronas post-mitóticas diferenciadas, observándose en la forma madura de la PPA (PPAm); mientras que en células en división, la fosforilación se presenta en las formas inmaduras de la PPA (PPAim) (Iijima *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 1994). La fosforilación de la Thr668 de la PPA es sustrato de diversas cinasas entre las que se encuentran la CDK5 (Cinasa dependiente de ciclina 5) y la GSK-3β (cinasa de la glucógeno sintasa-3β) para la PPA<sub>m</sub>, mientras que las cinasa CDK1/CDC2 actúa sobre la PPA<sub>im</sub> en células en división (Iijima *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*,

1994). Ante estímulos estresantes, la Thr668 de la PPA puede ser fosforilada por la cinasa JNK (*Cinasa N-terminal de c-jun*). La Thr668 se encuentra dentro del motivo <sup>667</sup>VTPEER<sup>672</sup>, cuya función es estabilizar una estructura de  $\alpha$ -hélice en la región C-terminal (Remelot *et al.*, 2000), su fosforilación induce cambios conformacionales en la región citoplasmática de la PPA modificando su interacción con la proteína Fe65, permitiéndole la translocación nuclear del dominio citoplásmico intracelular de la PPA, por lo que se postula la participación de esta vía en la activación genética en respuesta a estrés (Nakaya *et al.*, 2006).

El papel de la fosforilación en la Thr668 de la PPA es controversial, algunos reportes la han ligado con la generación de A $\beta$  (Ando *et al.*, 2001; Lee HG *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2005), mientras que otros no encuentran que esta fosforilación esté relacionada con la producción de A $\beta$  (Sano *et al.*, 2006).

### **V.3 CONDICIONES QUE PROPICIAN LA GENERACIÓN DE FRAGMENTOS AMILOIDOGÉNICOS.**

Existe evidencia de que diferentes factores pueden influir en la producción de A $\beta$ , y cuya presencia se ha documentado en la EA. Entre estos destacan: las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Yankner, 1996); algunos metales, como el Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, los cuales pueden interactuar de forma directa con el ARNm y/o la proteína PPA, además de ejercer un efecto sobre algunas de las proteínas involucradas en el procesamiento de la misma (Strausak *et al.*, 2001); y los niveles del AMPc (Lee *et al.*, 1999). En este sentido, existen algunos estudios epidemiológicos en donde se ha demostrado que situaciones que aumenten de manera crónica la concentración de adrenalina o noradrenalina favorecen el desarrollo de la EA. Sin embargo, hasta el momento se desconocen de qué manera estos factores pueden inducir una sobreproducción de A $\beta$  in vivo. Por lo tanto resulta fundamental para el conocimiento de la etiopatogenia de la EA, encontrar situaciones metabólicas que generen un exceso tanto en la producción de PPA como en la generación de A $\beta$ .

---

## VI. ESTRÉS OXIDANTE Y LA EA

---

Otro evento clave en la patología de la EA es el estrés oxidante, el cual se presenta de manera temprana (Nunomura *et al.*, 2001). Este es capaz de inducir daño nuclear, proteico y membranar, además de contribuir en la muerte celular (Perry *et al.*, 2000). Las neuronas parecen ser particularmente vulnerables al daño mediado por radicales libres, entre las razones que podrían explicar esta susceptibilidad están: 1) su bajo contenido de glutatión, un antioxidante celular (Cooper, 1997); 2) la alta proporción de ácidos grasos polinsaturados de la membrana neuronal (Hazle & Williams, 1990); y 3) que el metabolismo cerebral consume alrededor del 20% del oxígeno corporal, con lo que se generan una enorme cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Smith *et al.*, 1995).

La relación existente entre la toxicidad de la A $\beta$  y el estrés oxidante parece ser crucial en la enfermedad al ser ambos eventos dependientes de la edad (Floyd & Hensley, 2002) cuyos efectos están interrelacionados, como lo muestran algunos modelos *in vivo* e *in vitro* (Harkany *et al.*, 2000; Misonou *et al.*, 2000; Paola *et al.*, 2000). En este sentido, animales transgénicos que sobrepresan la PPA con mutaciones, presentan una sobreproducción de ERO, la cual precede a la formación de placas amiloides (Pratico *et al.*, 2001). Así mismo, Frederikse (1996) encontró que el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) incrementa la producción y acumulación de A $\beta$  en el cristalino.

Existen muchas evidencias más en este sentido, y es claro que el estrés oxidante juega un papel patológico importante. En estudios realizados en pacientes con la EA y en modelos animales se ha encontrado que la inhibición del metabolismo energético induce un incremento en la producción de ERO (Smith *et al.*, 2000), lo cual exacerba tanto la toxicidad como un aumento en la generación A $\beta$ . Esto es apoyado por un trabajo de Kaido (1996), quien reportó que pacientes muertos por padecimientos asociados con mutaciones del ADN mitocondrial, presentaban daño oxidante y presencia de placas de A $\beta$ .

Estudios en cerebro de pacientes con la EA muestran un aumento en la producción de aldehídos reactivos como la acroleína, presente en las marañas neurofibrilares, y el 4-

hidroxinonenal (4-HNE) (Markesbery & Carney, 1999), lo que confirma un estado de estrés oxidante generalizado. Sinaptosomas expuestos a la A $\beta$  exhiben un aumento en la generación de 4-HNE y otros marcadores de estrés oxidante (Subramaniam *et al.*, 1997), y el uso de compuestos antioxidantes es capaz de inhibir su generación. En un estudio reciente se encontró que el 4-HNE es capaz de elevar la expresión de la proteína BACE1 y así aumentar la generación de A $\beta$  (Tamagno *et al.*, 2005).

Durante el envejecimiento y en especial en la EA, un factor que parece contribuir de manera importante en el estado de estrés oxidante es la dishomeostasis de iones metálicos en el cerebro. Análisis histológicos realizados en cerebros de pacientes con la EA revelaron una gran acumulación de metales (Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>) dentro y en torno a las regiones con placas seniles. Así mismo, en estas regiones se detectó un aumento en marcadores de daño oxidante (Smith *et al.*, 1996). Dicho daño podría estar mediado por la generación de ERO, producto de la interacción de estos metales con la A $\beta$  (Sayre *et al.*, 2000).

Para revisión de este tema ir a la sección XV. Artículos Derivados del Proyecto de Investigación, en la página 65.

---

## VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

La EA se caracteriza por una sobreproducción de A $\beta$ , hasta el momento sólo se ha podido reproducir su acumulación en modelos transgénicos que sobre expresan PPA con algunas de las mutaciones descritas en humanos, de la llamada forma familiar de EA (EAF). En este sentido, no existe evidencia sobre qué factores del ambiente cerebral pueden alterar de manera significativa el metabolismo neuronal y modificar el procesamiento de la PPA silvestre o no mutada. El conocimiento del origen de la sobreproducción de A $\beta$  es relevante para entender parte de la etiopatogenia de esta enfermedad neurodegenerativa que ocurre de manera esporádica en más del 95% de los casos.

El propósito de este proyecto es estudiar factores celulares relacionados con la inducción de estrés oxidante, los cuales se ven alterados en el transcurso de la enfermedad (tales como el aumento de ERO), que sean capaces de promover la producción de A $\beta$  y estudiar el mecanismo de acción involucrado en el procesamiento amiloidogénico de la PPA.

Ya que la mayoría de los estudios realizados hasta el momento se enfocan en el efecto de las mutaciones de la PPA sobre el incremento en la producción de A $\beta$ , el conocimiento generado a partir de este trabajo, servirá para entender como algunos factores celulares asociados con el envejecimiento, influyen en el desequilibrio del metabolismo de la PPA humana silvestre e inducen la formación de A $\beta$  en la EA de origen esporádico. Conociendo el mecanismo de acción involucrado en la sobreproducción de la A $\beta$ , se podrán proponer y diseñar estrategias terapéuticas que controlen su acumulación.



---

## VIII. HIPÓTESIS

---

Bajo condiciones pro-oxidantes, se propicia el metabolismo de la proteína precursora del amiloide humana, hacia la ruta amiloidogénica, induciéndose un incremento en la generación de A $\beta$ .

---

## IX. OBJETIVOS

---

- Estudiar el efecto del estrés oxidante sobre el contenido de PPA y de A $\beta$  en células de neuroblastoma humano (línea celular MSN).
- Analizar el papel del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> como reguladores del metabolismo de PPA en la generación de A $\beta$ .
- Evaluar la expresión de las enzimas involucradas en la vía no amiloidogénica (ADAM10 y TACE).
- Estudiar la expresión de la enzima BACE y de algunas de las proteínas que integran el complejo de la  $\gamma$ -secretasa (Presenilina y Nicastrina), las cuales participan en el metabolismo amilodogénico de la PPA.
- Determinar cambios en el estado de fosforilación de la PPA como resultado de la inducción de condiciones pro-oxidantes, los cuales participan la generación de A $\beta$ .
- Estudiar la participación de la cinasa activada por estrés JNK en la generación de A $\beta$ .

---

## X. MÉTODOS

---

### X.1 CULTIVO DE NEUROBLASTOMA HUMANO

Los cultivos celulares de neuroblastoma humano MSN (Reynolds *et al.*, 1986), se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con aminoácidos no esenciales (1mM glutamina, 4.7mM serina y 3.8mM asparagina) y suero fetal bovino al 10% v/v (inactivado previamente, al calentarlo durante 1 hora a 60° C). Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por pozo y se incubaron a 37° C en una atmósfera húmeda al 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Tanto las células diferenciadas como las indiferenciadas se sometieron a distintos tratamientos durante 4, 24 y/o 48 horas. En la mayor parte de los experimentos, después de 24 hrs de cultivo, las células se diferenciaron a neuronas al adicionarles ácido retinóico 10 μM y NGF 50 ng/ml durante 5 días. Al terminar el periodo de diferenciación el medio se reemplazó por medio fresco y las neuronas se incubaron en presencia de los distintos tratamientos. En otra serie de experimentos, las células MSN se expusieron al inhibidor de la cinasa JNK, SP600125 (5 μM, Calbiochem), 1 h antes de agregar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FeCl<sub>2</sub>.

### X.2 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

#### *Ensayo de reducción del MTT*

La actividad mitocondrial se evaluó mediante una técnica colorimétrica, la cual cuantifica la actividad óxido-reductora de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta técnica se basa en la cuantificación de las sales de formazán, un producto insoluble de color morado, generadas a partir de la reducción del 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazodio (MTT), por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales en presencia de NADH (Mossman, 1983).

Transcurrido el periodo de incubación de los distintos tratamientos, se agrega el MTT (2% v/v) para obtener una concentración final de 10mM, y se incuban durante una hora más. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregaron 800μl de

isopropanol ácido (una mezcla de 2-isopropanol y HCl 1N) para así solubilizar las sales de formazán generadas. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los valores mostrados representan el promedio de 6-8 experimentos independientes realizados por cuadruplicado  $\pm$  error estándar (ES).

#### Ensayo de exclusión de azul de tripano

El otro método usado para evaluar la viabilidad celular fue el ensayo de exclusión de azul de tripano. Después de 24 hrs de tratamiento, las células fueron cosechadas en buffer de Krebs. Se incubaron volúmenes iguales (10  $\mu$ l) tanto de la solución de azul de tripano 0.4% (Gibco), así como del concentrado celular de cada uno de los distintos tratamientos. Las células capaces de excluir el azul de tripano se consideraron como viables, dicha cuantificación se realizó en un hemocitómetro. Los resultados se expresan como porcentajes en relación al control. Los valores mostrados representan el promedio de 6-8 experimentos independientes realizados por cuadruplicado  $\pm$  error estándar (ES).

### **X.3 CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) fueron determinadas por medio de un ensayo fluorométrico (Lee VM et al., 2003), el cual emplea a la dihidrorodamina 123 (DHR) como un compuesto sensible al ataque de las ERO (Sigma St. Louis MO, USA). Cuando la DHR es oxidada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de peroxidasas, se genera el compuesto fluorescente rodamina 123 (Gomes et al., 2005). Las células MSN fueron tratadas como se describió previamente para entonces ser cosechadas. De cada condición experimental se tomaron alicuotas de 100  $\mu$ l (alrededor de  $1 \times 10^5$  células) y se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm. Al precipitado se le agregaron 180  $\mu$ l de amortiguador conteniendo en mM: 140 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucosa y 15 HEPES, así como 20  $\mu$ l de DHR 1  $\mu$ M y se incubó durante 2 min a 37°C. . El producto fluorescente rodamina 123 fue cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 505 nm. Los resultados se expresan como porcentajes en relación al

control. Los valores mostrados representan el promedio de 6 experimentos independientes realizados por duplicado  $\pm$  error estándar (ES).

#### **X.4 EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE $A\beta_{42}$ POR ENSAYO DE ELISA**

Los niveles de  $A\beta_{42}$  se determinaron mediante el uso de un kit específico para la detección de dicha forma, de acuerdo a las recomendaciones especificadas en el manual (BioSources International, USA). Después de los tratamientos, previamente descritos, el medio de cultivo de las células MSN se recolectó y las muestras fueron analizadas por el ensayo de ELISA. La concentración de  $A\beta_{42}$  fue cuantificada en un lector de densidades ópticas a una longitud de onda de at 450 nm (BioRad Microplate Reader Model 550). Los resultados se expresan como porcentajes en relación al control. Los valores mostrados representan el promedio de 4 experimentos independientes realizados por duplicado  $\pm$  error estándar (ES).

#### **X.5 ELECTROFORESIS E INMUNOBLOT**

##### *Electroforesis*

Transcurrido el periodo de tratamiento, las células de neuroblastoma MSN se cosecharon usando un buffer de lisis (tris-HCL 50mM pH 7.5, NaCl 150mM, Nonidet P40 1%, desoxicolato 0.5%, cocktail de inhibidores de proteasas (Complete<sup>tm</sup>, Boehringer Mannheim). Las muestras se sometieron a 3 ciclos de sonicado. Cada ciclo consistió de 15 segundos de descargas a 40 kHz y 2 min de reposo, esto se realizó en hielo (4° C). Una vez sonicadas las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 75 min. La cuantificación de la concentración de proteína en el sobrenadante se realizó por el método de Lowry modificado (Lowry, 1951). Posteriormente se cargaron 25  $\mu$ g de proteína total, por condición, disuelta en un buffer de muestra en condiciones reductoras con 2- $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.05% y SDS (10% p/v). Las muestras se hirvieron durante 8 min a 95°C. Se utilizó gel al 10% acrilamida-SDS, el cual

se corrió a corriente constante, a 25 mA, en un buffer de corrida (tris-base, glicina y SDS pH 8.3).

#### *Electrotransferencia*

El gel se lavó en PBS durante 5 min y posteriormente se equilibró en el buffer de transferencia (25mM tris-base, 192mM glicina, metanol 20%) durante 5 min al igual que la membrana de transferencia (Hybond ECL Nitrocellulose, Amersham Pharmacia Biotech, IL). La transferencia se llevó a cabo en un sistema de cámara húmeda durante 8-16 horas a 250 mA.

#### *Inmunoblots*

Posterior a la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó a 4°C durante toda la noche con una solución PBS-leche descremada al 5%. Entonces la membrana se incubó a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-Alzheimer Precursor Protein A4 (22C11) (1:500, Chemicon International), policlonal anti-Alzheimer A4 (I-17): sc-7497 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) para la detección del sPPA $\alpha$ , policlonal anti-ADAM10 (1:500, Chemicon International), policlonal anti-TACE/ADAM17 (1:500, Chemicon International), monoclonal anti-BACE (1:500, Chemicon International), monoclonal anti-Presenilina-1 (1:500, Chemicon International), policlonal anti-Nicastrina (N-19): sc-14369 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), policlonal anti-Fosfo-PPA(Thr668) (1:500, Cell Signaling) y monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (1:500, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Después de 3 lavados de 5 min con PBS/albúmina 5%/tween 20 0.1%, la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa: cabra anti-ratón IgG (1:10,000 Zymed), cabra anti-conejo IgG (1:15,000 Santa Cruz, Biotechnonology, Inc.) y pollo anti-cabra IgG (1:15,000 Chemicon International) La membrana se lavó (3 veces/5min) para ser revelada por un método de quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL). La detección se realizó por medio de un film Kodak X-Omat. El control

negativo se obtuvo por la omisión del anticuerpo primario. El análisis densitométrico de los inmunoblots se realizó por medio del software NIH 1.38x ImageJ. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica (UDO). Los valores mostrados representan el promedio de 6-8 experimentos independientes  $\pm$  error estándar (ES).

#### **X.6 IMMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA**

Las células MSN fueron cultivadas sobre cubreobjetos. Al concluir los distintos tratamientos, se hicieron 2 lavados en PBS frío durante 5 min, tras lo cual, se fijaron durante 5 minutos en metanol (previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) y nuevamente se lavaron (2 veces/5 min en PBS frío). Las células se permeabilizaron con una solución de PBS/Tritón X-100 0.3%/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubó toda la noche en solución de bloqueó (PBS/2% normal horse serum). Entonces las células se incubaron por 24 hrs con los anticuerpos primarios: monoclonal anti-Alzheimer Precursor Protein PPA643-95 (1:500, Chemicon International), policlonal cabra anti-Alzheimer A4 (I-17): sc-7497 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), policlonal conejo anti-ADAM10 (1:500, Chemicon International) y monoclonal anti-BACE (1:500, Chemicon International). Se hicieron 3 lavados de 5 min en PBS frío e inmediatamente después las células se incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario biotinilado: anti-ratón IgG (1:10,000 Vector Laboratories, Burlingame, CA), anti-conejo IgG (1:4000 Vector Laboratories, Burlingame, CA) o anti-cabra IgG (1:4000 Vector Laboratories, Burlingame, CA), y se lavaron nuevamente (3 veces/5 min en PBS frío). Las células se trataron con el kit ABC-biotinavidin peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se revelaron con diaminobenzidina. El control negativo se obtuvo por la omisión del anticuerpo primario.

Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células fueron incubadas durante 24 hrs. con el anticuerpo monoclonal ratón anti-p-JNK (Phosphorylated Thr-183 and Tyr-185, 1:250) (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado de cabra TRITC- anti-ratón (1:250, Zymed Laboratories, San Francisco, CA).

Los núcleos fueron teñidos al incubar las células de neuroblastoma MSN durante 5 min con DAPI (1 mg/ml). Las células se analizaron con un microscopio confocal (Zeiss, LSM 5 Pascal, Axioplan 2), así como con un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioscop 40). El control negativo se obtuvo por la omisión del anticuerpo primario.

#### ***X.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

Las diferencias significativas se obtuvieron al analizar los datos con la prueba de t de student de forma no pareada y una ANOVA seguida de una prueba de Scheffe. Todos los valores mostrados representan el promedio  $\pm$  error estándar (ES).

## XI. RESULTADOS

---

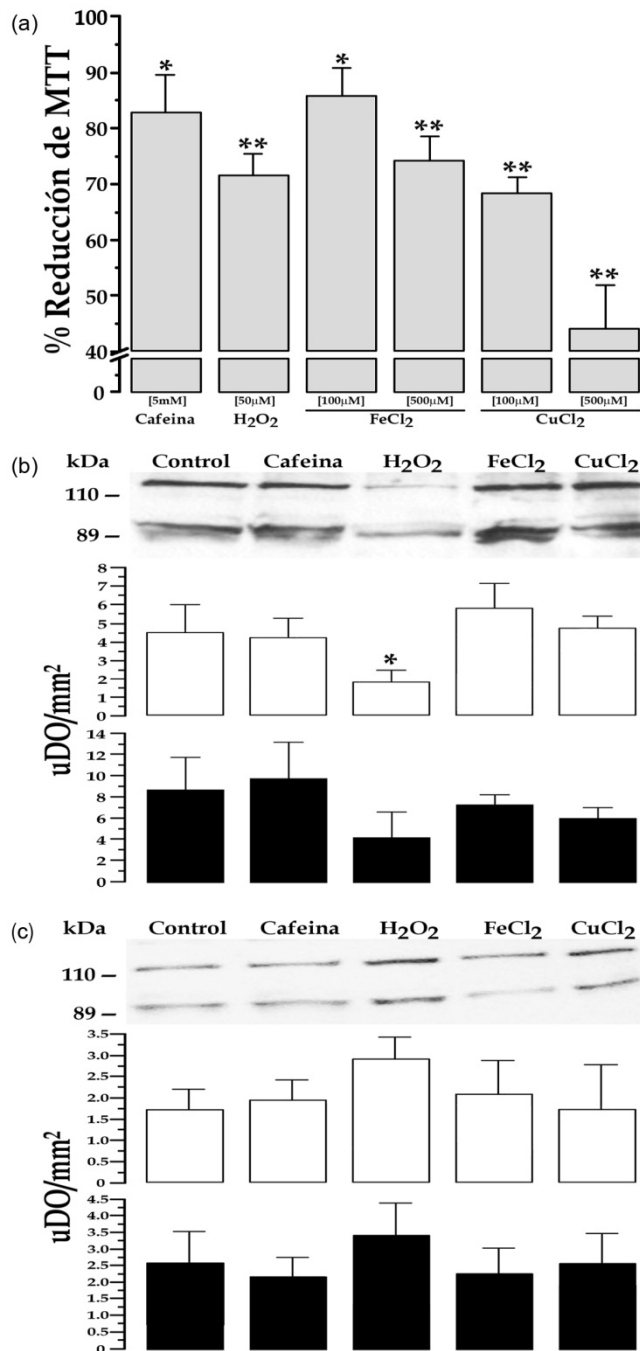
*Efecto de la exposición aguda a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y metales sobre el contenido de PPA en células indiferenciadas.*

El uso de cultivos celulares nos permitió estudiar de manera más detallada y bajo condiciones controladas el metabolismo de la PPA. En el presente trabajo utilizamos una línea celular humana de neuroblastoma, MSN, con el fin de evaluar el efecto del estrés oxidante sobre el contenido y regulación de la PPA silvestre.

En la primer serie experimental, que se presenta en la figura 1, células de neuroblastoma MSN no diferenciadas fueron expuestas durante 4 horas a distintos tratamientos, utilizando las siguientes concentraciones: cafeína [5mM], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50μM], FeCl<sub>2</sub> [100μM y 500μM] y CuCl<sub>2</sub> [100μM y 500μM]. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo se cambió y 20 horas después se determinó la viabilidad celular por medio de la cuantificación del MTT reducido (*Fig.1a*). Los resultados en este sentido mostraron una disminución significativa en el porcentaje de reducción de MTT respecto a la condición control. Los valores observados fueron los siguientes: 82.8% en el caso de los cultivos expuestos a cafeína; 71.5% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 85.9% y 74.1% en las células tratadas con FeCl<sub>2</sub> a las concentraciones de 100 y 500μM respectivamente; y 68.4% a una concentración de 100μM de CuCl<sub>2</sub> y 44.1% con 500μM. De manera general, la morfología celular no mostró alteraciones importantes, excepto en los cultivos expuestos a la concentración alta de CuCl<sub>2</sub> [500μM].

A partir de los resultados anteriores, decidimos evaluar el contenido de PPA tanto en la fracción citosólica como en la membranal, así como los niveles de Aβ en el medio de cultivo, utilizando las siguientes concentraciones: cafeína [5mM], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50μM], FeCl<sub>2</sub> [100μM] y CuCl<sub>2</sub> [100μM]. Como se observa en la figura 1b, la exposición durante 4 horas, indujo una disminución clara en los niveles totales de PPA (110 y 90 kDa) en los cultivos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El resto de los tratamientos no produjeron cambios en el contenido de PPA en relación con las condiciones control. De manera interesante, la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generó un incremento en el contenido de PPA total en

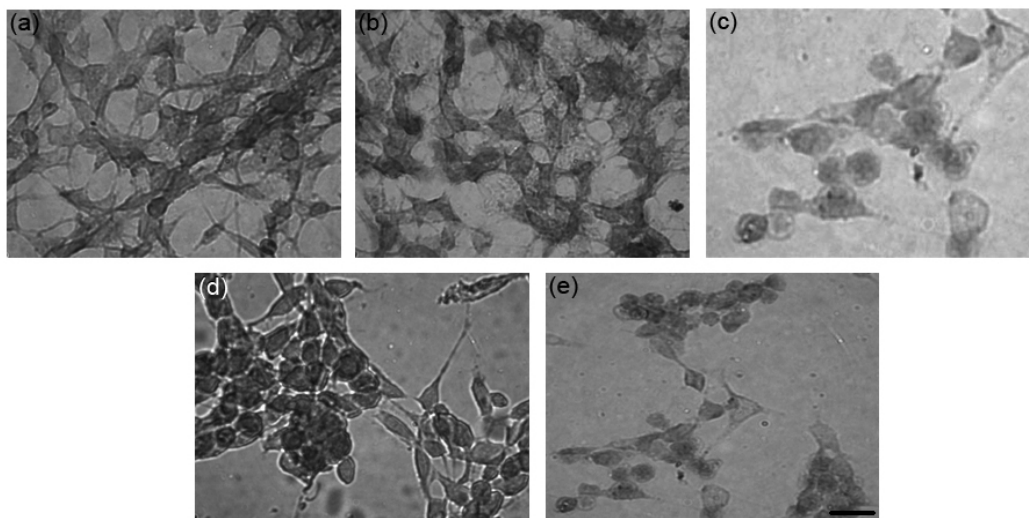




**Fig. 1 Efecto de la exposición aguda a condiciones pro oxidante sobre los niveles de PPA en células de neuroblastoma humano no diferenciadas.** (a) Reducción de MTT en cultivos de células MSN expuestas durante 4 horas a distintos tratamientos: cafeína [5mM], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50µM], FeCl<sub>2</sub> [100 y 500µM] y CuCl<sub>2</sub> [100 y 500µM]. Los datos representan el porcentaje en relación al control ± ES de 4 determinaciones independientes hechas por triplicado. Control \* p < 0.05; \*\* p < 0.001. Western blots representativos y análisis densitométrico que muestra los niveles de PPA y sPPAα tanto en la fracción citosólica (b) como en la membranal (c) de células MSN expuestas durante 4 horas a: cafeína [5mM], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50µM], FeCl<sub>2</sub> [100µM] y CuCl<sub>2</sub> [100µM]. El análisis densitométrico se expresa en unidades de densidad óptica sobre mm<sup>2</sup> (uDO/mm<sup>2</sup>). Los datos representan el porcentaje en relación al control ± ES de 3 determinaciones independientes. Control \* p < 0.05

la fracción membranal (Fig. 1c). Por esta técnica (western-blot), el A $\beta$  no pudo ser detectado en el medio de cultivo debido a los bajos niveles en su contenido, excepto en los cultivos expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (datos no mostrados).

En la figura 2 se muestra la localización de PPA determinada a través de un análisis inmunohistoquímico. Las células MSN no diferenciadas, tratadas bajo las condiciones previamente descritas, presentaron de manera general, una distribución homogénea de la PPA a través de la célula. La inmunoreactividad para PPA al ser tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 2c) y CuCl<sub>2</sub> (Fig. 2e) se encontró disminuida en comparación con las células control (Fig. 2a). Interesantemente, el tratamiento con FeCl<sub>2</sub> induce cambios morfológicos aunque el contenido de PPA aparentemente no se ve alterado (Fig. 2d).

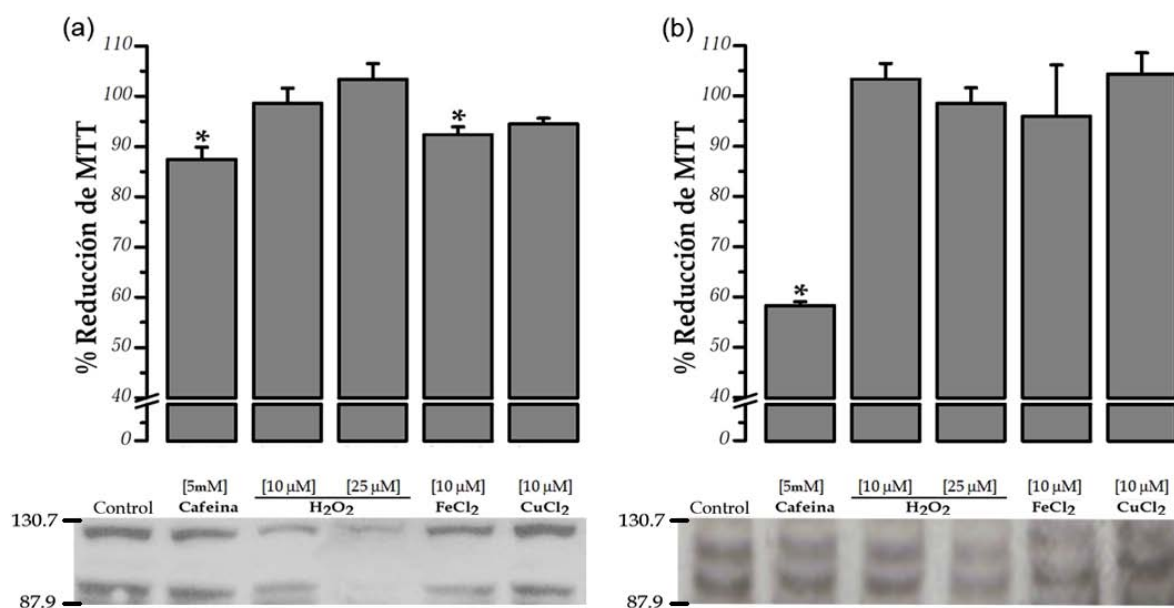


**Fig. 2 Distribución de la PPA en células de neuroblastoma humano no diferenciadas.** En las micrográficas se muestra la inmunoreactividad para la PPA en células MSN después de 4 horas de exposición a distintos tratamientos: (a) control; (b) Cafeína 5mM; (c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50µM; (d) FeCl<sub>2</sub> 100µM; y (e) CuCl<sub>2</sub> 100µM. Barra de escala 50 µm. Se muestran imágenes representativas de 4 determinaciones independientes hechas por triplicado.

En otra serie experimental, las células MSN se sometieron a tratamientos de 24 y 48 horas. Las dosis utilizadas en las distintas condiciones fueron: cafeína [5 mM], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25µM y 10µM], FeCl<sub>2</sub> [10µM] y CuCl<sub>2</sub> [10µM]. Después de 24 hrs de incubación (Fig. 3a),

se observó una ligera disminución en los porcentajes de reducción de MTT, siendo significativos sólo en presencia de  $\text{FeCl}_2$  y cafeína (92% y 88% respectivamente). En el caso de los cultivos tratados durante 48 hrs (Fig. 3b), la reducción de MTT no se vio alterada de manera significativa, excepto en presencia de cafeína, donde el valor fue de 58% en relación al control.

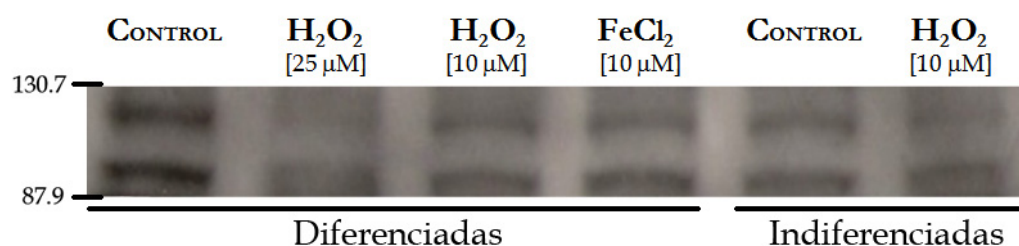
Al igual que en los experimentos de exposición aguda, decidimos evaluar el contenido total de PPA en la fracción soluble en células MSN tratadas durante 24 (Fig. 3a) y 48 (Fig. 3b) horas. Como se aprecia en la figura 3, el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  indujo una clara disminución en el contenido de PPA. A diferencia de lo observado con los tratamientos agudos, la exposición a  $\text{FeCl}_2$  reduce los niveles de PPA aunque en una proporción menor en comparación con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estos cambios en los niveles de PPA se observaron en ambos tiempos de incubación estudiados, aunque parecen no ser tan marcados en los cultivos expuestos durante 48 horas.



**Fig. 3 Contenido de PPA en células MSN indiferenciadas sometidas a tratamientos crónicos.** Reducción de MTT y Western blots representativos de cultivos celulares expuestos durante 24 (a) y 48 (b) horas a distintos tratamientos: cafeína [5mM],  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10 y 25µM],  $\text{FeCl}_2$  [10µM] y  $\text{CuCl}_2$  [10µM]. Los datos representan el porcentaje en relación al control  $\pm$  ES de 4 determinaciones independientes hechas por triplicado. Control \*  $p < 0.05$

### Contenido de PPA en células de neuroblastoma MSN diferenciadas.

Una vez determinado el efecto de los tratamientos arriba descritos sobre los niveles de PPA en células indiferenciadas, decidimos evaluar si la exposición a cafeína [5 mM], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25 μM y 10 μM], FeCl<sub>2</sub> [10 μM] y CuCl<sub>2</sub> [10 μM] durante 24 o 48 horas también inducía alteraciones en los niveles de PPA en células MSN diferenciadas. En este sentido, encontramos que de manera general el contenido de PPA en los cultivos de células diferenciadas expuestas a estos tratamientos presentan cambios similares a los reportados en la Fig. 3. Cabe señalar que los niveles totales de PPA son mayores en las células MSN después de inducir su diferenciación (Fig. 4). A partir de estos resultados, en las siguientes series experimentales decidimos utilizar células diferenciadas incubadas durante 24 hrs con concentraciones subtóxicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25 μM] y FeCl<sub>2</sub> [10 μM], al ser estas las condiciones en donde observamos los cambios más evidentes.



**Fig. 4 La diferenciación celular induce un incremento en los niveles de PPA.** Western blots representativo que muestra niveles superiores de PPA en células neuroblastoma humano MSN diferenciadas al compararlas con células en estado indiferenciado. Imágenes representativas de 3 determinaciones independientes.

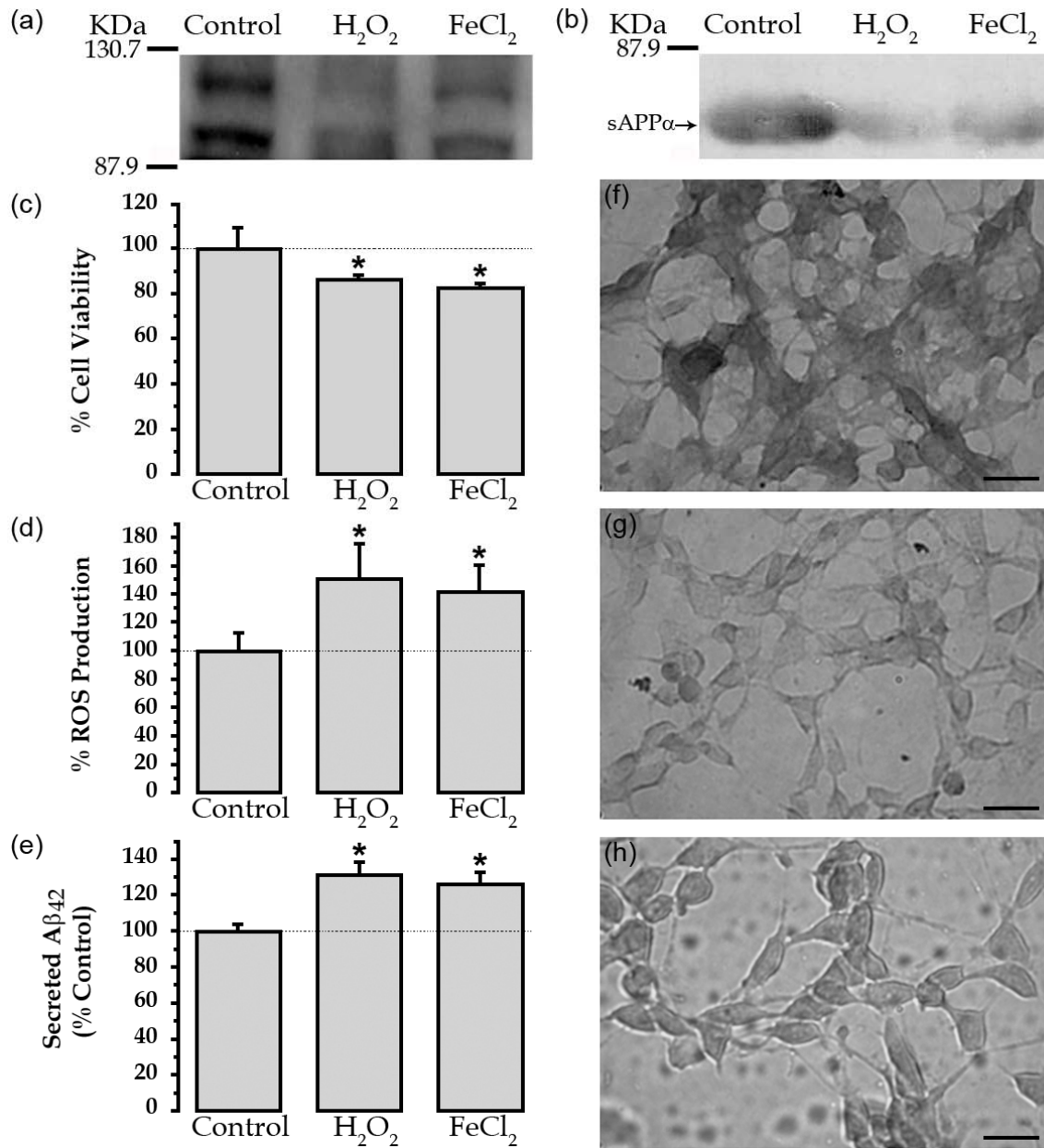
### El estrés oxidante reduce el contenido de PPA y de sPPA $\alpha$ .

Inicialmente analizamos los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FeCl<sub>2</sub> sobre los niveles de PPA, sPPA $\alpha$  y A $\beta$  en células MSN, así como su viabilidad y estado oxidante. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 μM) y FeCl<sub>2</sub> (10 μM) indujeron un incremento significativo de alrededor de 50% y 40% respectivamente, en la producción de especies reactivas de oxígeno (Fig. 5d) sin

detrimento de la viabilidad celular, la cual disminuye entre un 15% y 20% respectivamente (Fig. 5c). En la figura 5 se muestra que la presencia de agentes pro-oxidantes disminuyen de manera significativa los niveles de de PPA total, así como la forma secretada no amiloidogénica (sPPA $\alpha$ ) como se observa por Western-blot (Fig. 5a-b) e inmunohistoquímica (Fig. 5f-h). Bajo estas condiciones, se presenta un incremento de alrededor del 30% en los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> secretados (Fig. 5e). Estos datos nos sugieren que el estrés oxidante favorece el procesamiento amiloidogénico de la PPA.

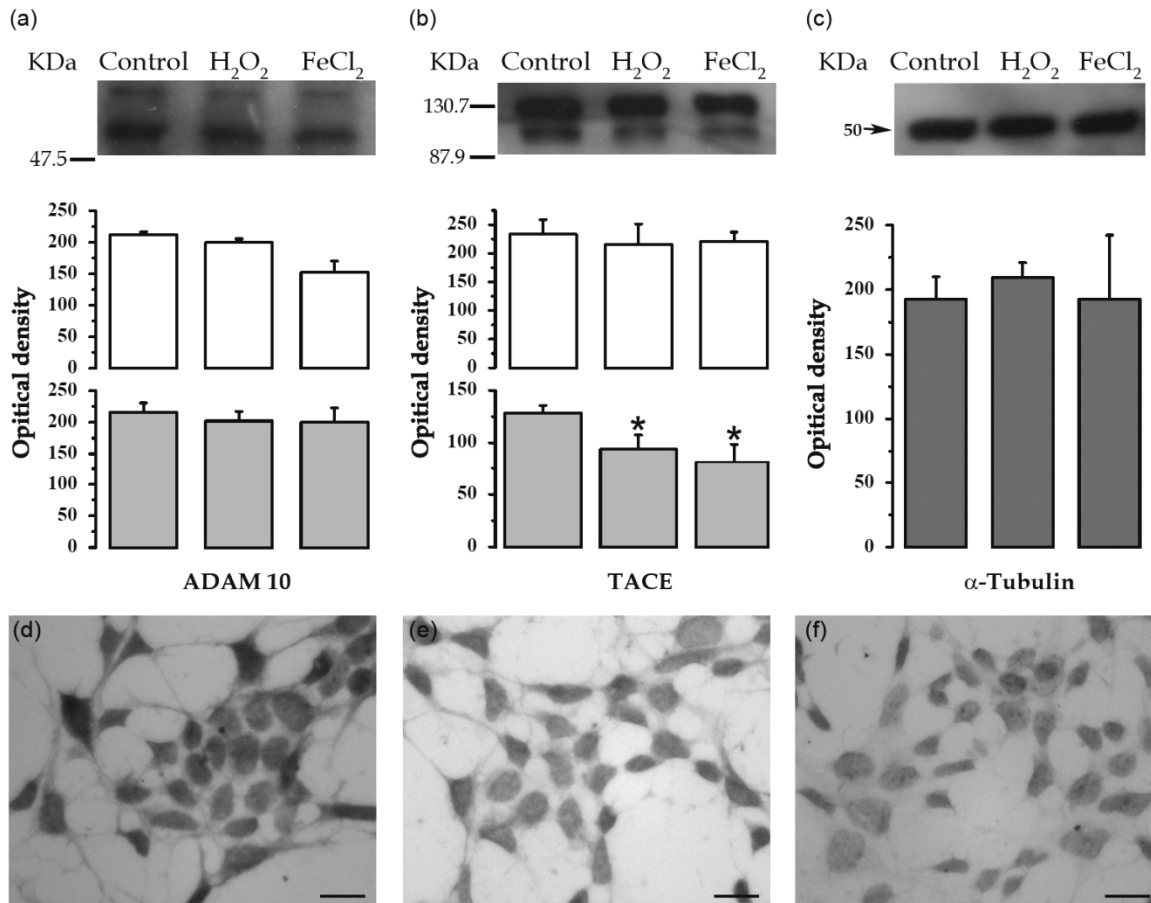
*Los niveles de expresión de enzimas con actividad de  $\alpha$ -secretasa disminuyen después de la exposición a estrés oxidante.*

Con el fin de determinar si la reducción observada en los niveles de sPPA $\alpha$  y la producción de A $\beta$ <sub>42</sub> estaban asociados con un cambio diferencial inducido por ERO, sobre la expresión de la  $\alpha$ -secretasa, decidimos estudiar los niveles celulares de las proteínas ADAM-10 y TACE. Se ha reportado que estas enzimas poseen actividad de  $\alpha$ -secretasa, siendo capaces de cortar a la PPA dentro del dominio de la A $\beta$ , impidiendo su generación y promoviendo la secreción del fragmento sPPA $\alpha$ . Bajo las distintas condiciones estudiadas, en la fracción celular se detectó dos bandas inmunoreactivas para la ADAM-10. La banda superior corresponde a la pro-enzima, enzimáticamente inactiva (con un peso molecular aparente de 85 kDa); mientras que la inferior corresponde a la forma metabólicamente activa de ADAM-10 (con un peso molecular aparente de 68 kDa). En presencia FeCl<sub>2</sub>, se observa una ligera reducción en la forma metabólicamente activa (Fig. 6a). En tanto, una disminución en los niveles ADAM-10 fue más evidente por inmunohistoquímica, al comparar las células control (Fig. 6d) con las expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 6e) y FeCl<sub>2</sub> (Fig. 6f) durante 24 hrs bajo las mismas condiciones, la enzima TACE se mostró más sensible a los tratamientos inductores de estrés oxidante, presentándose una disminución significativa (~50%) en los niveles de proteína, como se observa claramente en la banda inferior, la cual corresponde a la forma madura de TACE, metabólicamente activa (Fig. 6b). Estos resultados demuestran



**Fig. 5 Condiciones inductoras de estrés oxidante reducen los niveles de PPA y sPPAα concomitante a un incremento en la secreción de Aβ<sub>42</sub> en células de neuroblastoma humano diferenciadas.** (a) Western blot representativo de la PPA en células MSN incubadas durante 24 hrs en presencia de: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25μM] y FeCl<sub>2</sub> [10 μM]. (b) Western blot representativo de la sPPAα secretada al medio de cultivo. En (c) se observa la viabilidad celular, evaluada con el uso de la prueba de exclusión de azul de tripano. La generación de especies reactivas de oxígeno como resultado de los distintos tratamientos se muestra (d). Los niveles de Aβ<sub>42</sub> secretados se determinaron por una prueba de ELISA (e). En las micrografías se muestra la inmunoreactividad para PPA en células MSN bajo condiciones control (f) y después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (g) o FeCl<sub>2</sub> (h). Barra de escala 50 μm. Los resultados se expresan como porcentajes en relación al control. Los valores mostrados representan el promedio de 6-8 determinaciones independientes realizadas por cuadruplicado ± error ES. Control \* p < 0.05

que el decremento en el contenido proteico de enzimas con actividad de  $\alpha$ -secretasa es un evento asociado a un estado de estrés oxidante, el cual puede contribuir a una elevación en los niveles de  $A\beta_{42}$  secretados.

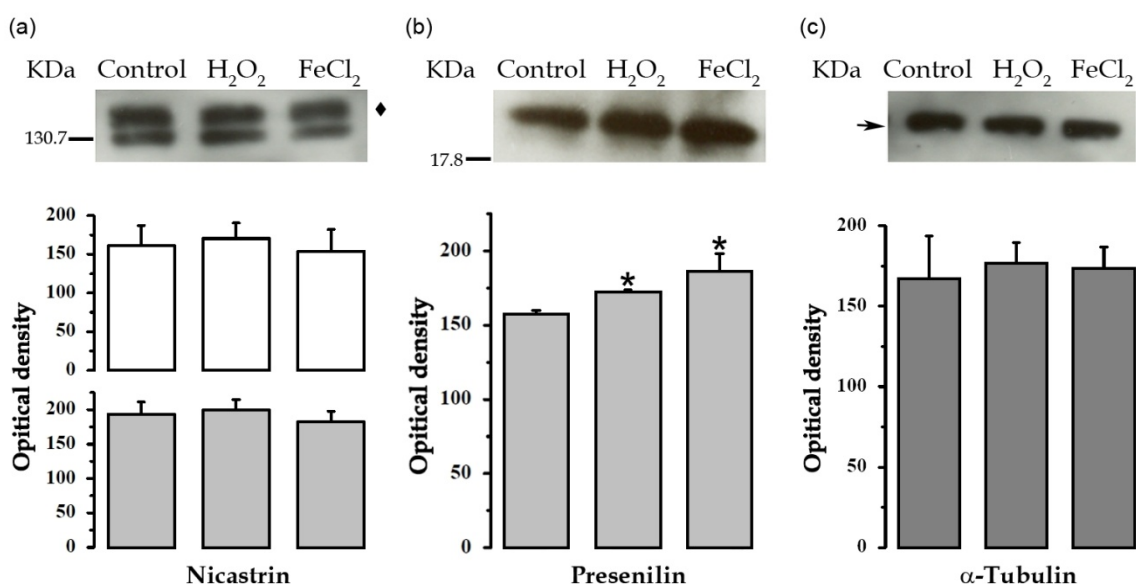


**Fig. 6 Los tratamientos inductores de estrés oxidante disminuyen los niveles de proteínas con actividad de  $\alpha$ -secretasa involucradas en el procesamiento no amilodogénico de la PPA en células MSN diferenciadas.** Western blots representativos y análisis densitométrico que muestra los niveles de ADAM10 (a), TACE (b) and  $\alpha$ -Tubulina (c), después de 24 hrs de tratamiento con:  $H_2O_2$  [25 $\mu$ M] and  $FeCl_2$  [10  $\mu$ M]. La banda superior muestra a la forma inmadura, metabólicamente inactiva, de ADAM10 o TACE; en cada caso la banda inferior muestra la forma madura de las enzimas. En las micrografías se muestra la inmunoreactividad para ADAM10 en células MSN bajo condiciones control (d) y después del tratamiento con  $H_2O_2$  (e) o  $FeCl_2$  (f). Barra de escala 50  $\mu m$ . El análisis densitométrico se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica (UDO). Los valores mostrados representan el promedio de 6 determinaciones independientes realizadas por duplicado  $\pm$  ES. Control \*  $p < 0.05$

*El estrés oxidante regula positivamente la expresión de Presenilina 1 and BACE1.*

Una vez demostrada la participación del estrés oxidante en la disminución de los niveles proteicos de las enzimas involucradas en el procesamiento no amilodogénico

de la PPA, decidimos examinar el efecto de las condiciones pro-oxidantes sobre dos elementos del complejo de la  $\gamma$ -secretasa: presenilina 1, que posee la actividad catalítica del complejo y nicastrina, la cual participa en la estabilización de la  $\gamma$ -secretasa. En la Fig. 7 se muestra que los niveles de nicastrina (tanto la forma inmadura como la madura, con un peso molecular de alrededor de 140 y 130 kDa respectivamente) no presentan cambios en presencia de  $H_2O_2$  o  $FeCl_2$  (Fig. 7a). Por otro lado, los niveles de la presenilina 1 muestran un incremento significativo al ser expuestas a las mismas condiciones inductoras de estrés (Fig. 7b).

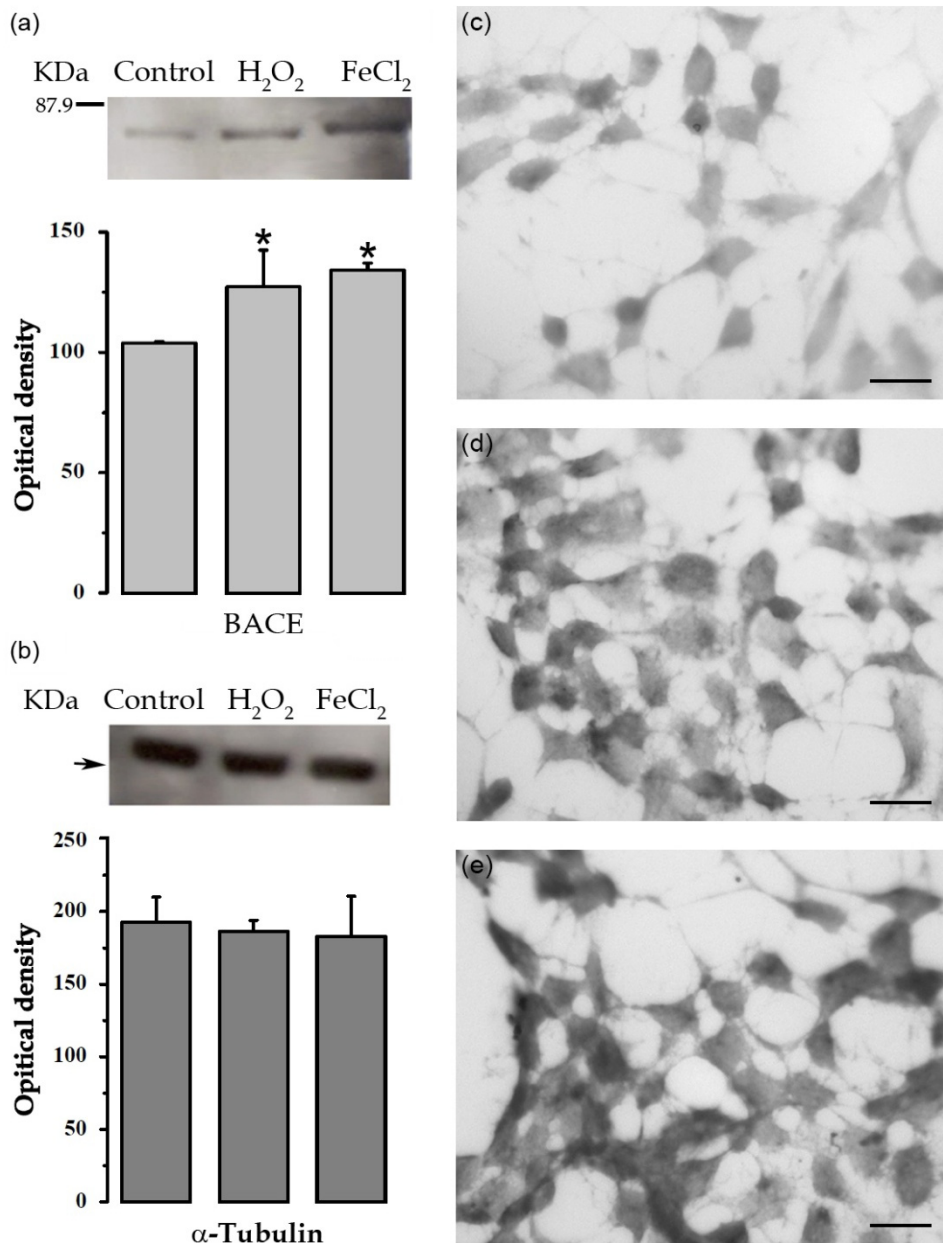


**Fig. 7 Efectos de tratamientos inductores de estrés oxidante sobre los niveles de proteínas pertenecientes al complejo de la  $\gamma$ -secretasa involucrado en el procesamiento amilodogénico de la PPA.** Westerns blots representativos y análisis densitométrico que muestra los niveles de nicastrina (a), Presenilin1 (b) y  $\alpha$ -Tubulina (c), después de 24 hrs de tratamiento con:  $H_2O_2$  [25 $\mu$ M] and  $FeCl_2$  [10  $\mu$ M]. La banda superior (marcada con el rombo negro) indica la forma inmadura de la Nicastrina, mientras que la banda inferior muestra la forma su activa. El análisis densitométrico se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica (UDO). Los valores mostrados representan el promedio de 6 determinaciones independientes realizadas por duplicado  $\pm$  ES. Control \*  $p < 0.05$

Debido a que BACE1 es la enzima limitante en la generación de  $A\beta$ , decidimos determinar si el estrés oxidante también es capaz de incrementar los niveles de esta enzima. Células MSN diferenciadas fueron expuestas a ambos estímulos pro-oxidantes durante 24 hrs, como consecuencia, se observó un incremento de alrededor del 30% en la expresión de BACE1 (Fig. 8a). Al realizar una inmunohistoquímica, se observó este



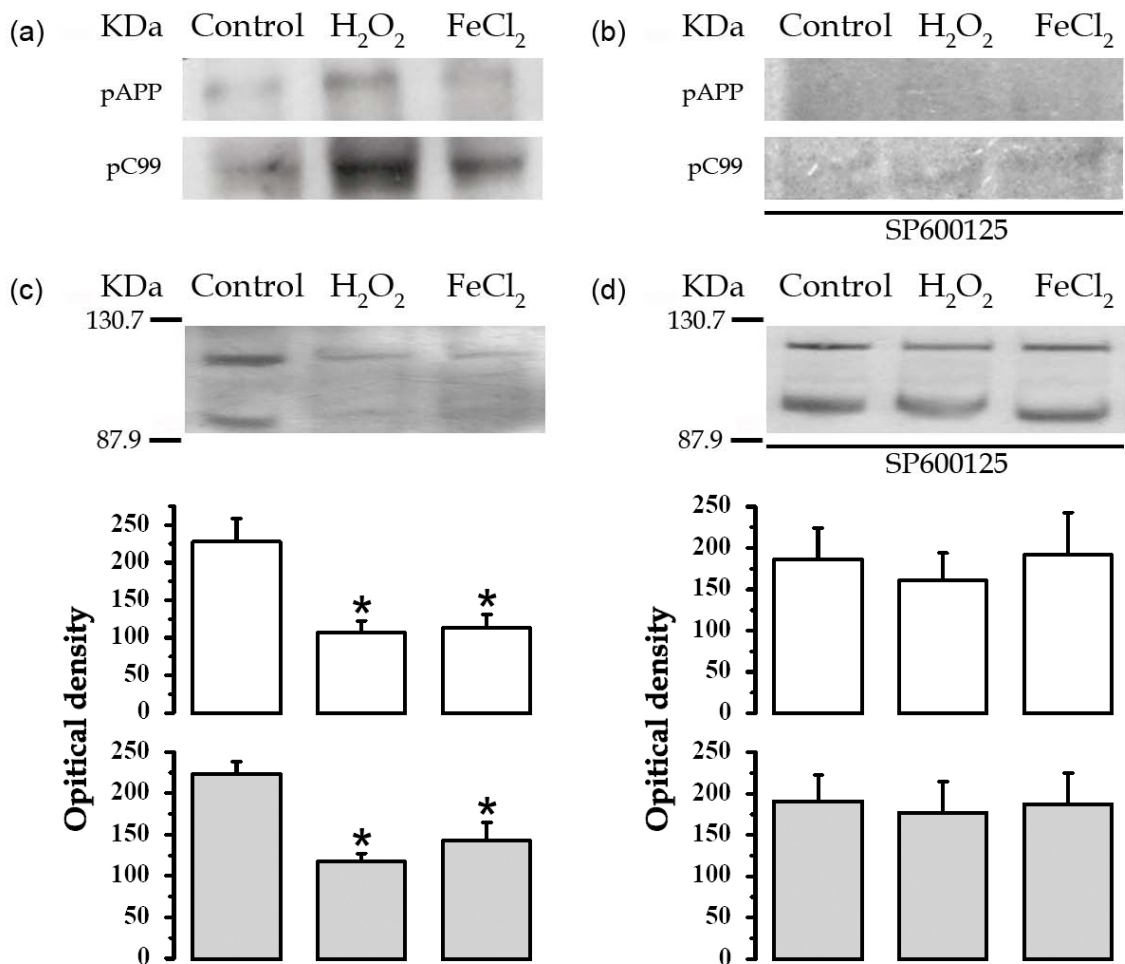
mismo efecto al comparar el contenido de BACE1 en células control (Fig. 8c) respecto a células MSN expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 8d) y FeCl<sub>2</sub> (Fig. 8e).



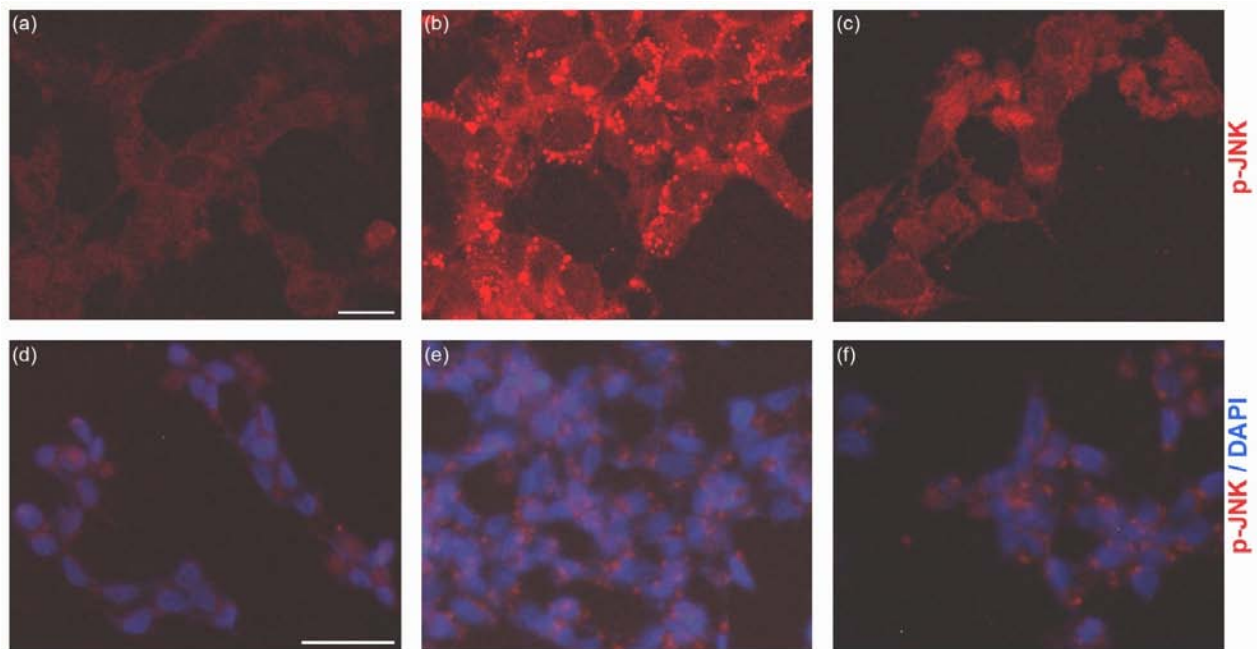
**Fig. 8** Los niveles de β-secretase, enzima limitante en la generación de Aβ, se incrementan bajo condiciones de estrés oxidante. Westerns blots representativos y análisis densitométrico que muestra los niveles de BACE1 (a) y α-Tubulina (b), después de 24 hrs de tratamiento con: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25μM] and FeCl<sub>2</sub> [10 μM]. En las micrograffías se muestra la inmunoreactividad para BACE1 en células MSN bajo condiciones control (c) y después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d) o FeCl<sub>2</sub> (e). Barra de escala 50 μm. El análisis densitométrico se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica (UDO). Los valores mostrados representan el promedio de 6 determinaciones independientes realizadas por duplicado ± ES. Control \* p < 0.05

*La fosforilación de la Thr668 de la PPA mediado por la cinasa JNK está asociada con su procesamiento a través de la vía amiloidogénica.*

Tras demostrar que el estrés oxidante promueve un aumento en los niveles de proteínas involucradas en la vía amiloidogénica, quisimos averiguar cuál podría ser el mecanismo que liga al estrés oxidante con el procesamiento exacerbado de la PPA. Aunque existe controversia acerca del papel que juega la fosforilación de la Thr668 (pThr668) de la PPA en el procesamiento amiloidogénico, encontramos un incremento de este fosfoepítipo después de exponer células diferenciadas MSN durante 24 hrs a  $H_2O_2$  o  $FeCl_2$ . En este sentido, demostramos la aparición de formas fosforiladas tanto de PPA, así como del fragmento proteolítico C99 (Fig. 9a), concomitante a una reducción del contenido total de PPA (Fig. 9c). Esto sugiere que BACE1 estaría actuando sobre el sitio- $\beta$  en la PPA, produciendo un aumento en el contenido de la forma fosforilada de la Thr668-C99 (Fig. 9a). En este sentido, se ha reportado (Kimberly *et al.*, 2005) que la aparición del fosfoepítipo pThr668 bajo condiciones de estrés oxidante depende principalmente de la activación de la cinasa JNK. En otra serie de experimentos, probamos el efecto del inhibidor selectivo de JNK, SP600125, sobre la fosforilación de la Thr668 y el procesamiento de la PPA. Como se puede observar, las células expuestas a  $H_2O_2$  o  $FeCl_2$  e incubadas con el inhibidor SP600125, no muestran cambios en la inmunoreactividad para el fosfoepítipo pThr668 (Fig. 9b). Así mismo, los niveles totales de PPA no se encuentran alterados a pesar de estar expuestas a un ambiente pro-oxidante (Fig. 9d). Finalmente, apoyándonos en estudios de inmunofluorescencia evaluamos la activación de la cinasa JNK. En células expuestas a  $H_2O_2$  y  $FeCl_2$  (Fig. 10b y 10c respectivamente) se observó un incremento en la señal de JNK fosforilada (su forma activa), así como su acumulación nuclear (Fig. 10e y 10f respectivamente) en relación a las condiciones control (Fig. 10a y 10d). Estos resultados sustentan la participación de JNK en la fosforilación de la Thr668 de la PPA producto de la inducción de un estado de estrés oxidante.



**Fig. 9 Participación de JNK en la fosforilación de la Thr668 de la PPA.** Westerns blots representativos que muestran la expresión de las formas fosforiladas de PPA y el fragmento C99 en ausencia (a) o presencia (b) del inhibidor de JNK, SP600125 [5 $\mu$ M]. Análisis densitométrico y Westerns blots representativos de los niveles totales de PPA en ausencia (c) o presencia (d) de SP600125. El análisis densitométrico se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica (UDO). Los valores mostrados representan el promedio de 4 determinaciones independientes realizadas por duplicado  $\pm$  ES. Control \*  $p < 0.05$



**Fig. 10** La exposición de células MSN a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FeCl<sub>2</sub> induce un aumento en los niveles de la forma activa de JNK, así como su relocalización celular. (a y d) Células control muestran inmunoreactividad moderada para la fosfo-JNK, la cual se localiza en el soma y los procesos celulares principalmente. (b y e) Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [25μM] y (c y f) FeCl<sub>2</sub> [10μM] inducen una intensa inmunoreactividad en el núcleo y soma. En rojo se aprecia la distribución de la fosfo-JNK y en azul se muestra el núcleo teñido con DAPI. Micrografías representativas de 3 experimentos realizados por cuadruplicado. Barra de escala = 20 μm (a–c) y 50 μm (d–f).

---

## XII. DISCUSIÓN

---

En este trabajo demostramos que durante la exposición a condiciones pro-oxidantes ( $H_2O_2$  o  $FeCl_2$ ) las células de neuroblastoma humano presentan una modulación diferencial de las principales enzimas proteolíticas involucradas en el procesamiento de la PPA. Es relevante que en nuestro modelo, el cual expresa de manera normal la PPA silvestre humana, se observó un aumento en la generación de  $A\beta_{42}$ , como resultado de un decremento en la expresión de enzimas con actividad de  $\alpha$ -secretasa (encargada del procesamiento no amiloidigénico) y un incremento en la expresión de BACE1 y presenilina (involucradas en el procesamiento amiloidigénico).

La importancia del estrés oxidante en la patogenia de la enfermedad ha sido ampliamente sustentada con evidencia experimental en pacientes con EA, encontrando una relación entre la extensión del daño cerebral y la presencia de marcadores oxidantes. En algunos de estos estudios se demostró un incremento en la oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos en el cerebro de pacientes con EA (Behl & Moosmann, 2002; Butterfield, 2002) así como concentraciones elevadas de Fe (III) y Cu (II) dentro de las placas seniles. La presencia de estos metales promueven la agregación del  $A\beta$ , además de potenciar el estrés oxidante mediado por metales asociado a la formación misma de las placas seniles (Huang *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1997). Otros estudios han detectado un incremento en el contenido de productos de la oxidación lipídica, como lo son los isoprostanos, en plasma y cerebro de paciente con EA, así como en ratones transgénicos que sobre expresan una forma mutada de la PPA humana (Praticò *et al.*, 2000, 2001; Montine *et al.*, 2005). Por otro lado, linfoblastos y fibroblastos de pacientes con EA familiar presentan un aumento en los niveles de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi 2-nonenal (Cecchi *et al.*, 2002).

Actualmente se ha establecido que condiciones pro-oxidantes pueden regular el procesamiento de la PPA, a través de la modulación de la expresión y la actividad la enzima BACE1 (Tong *et al.* 2005; Tamagno *et al.*, 2005, 2008a; Shen *et al.*, 2008) y la actividad de la  $\gamma$ -secretasa (Tamagno *et al.*, 2008a). En este trabajo ampliamos

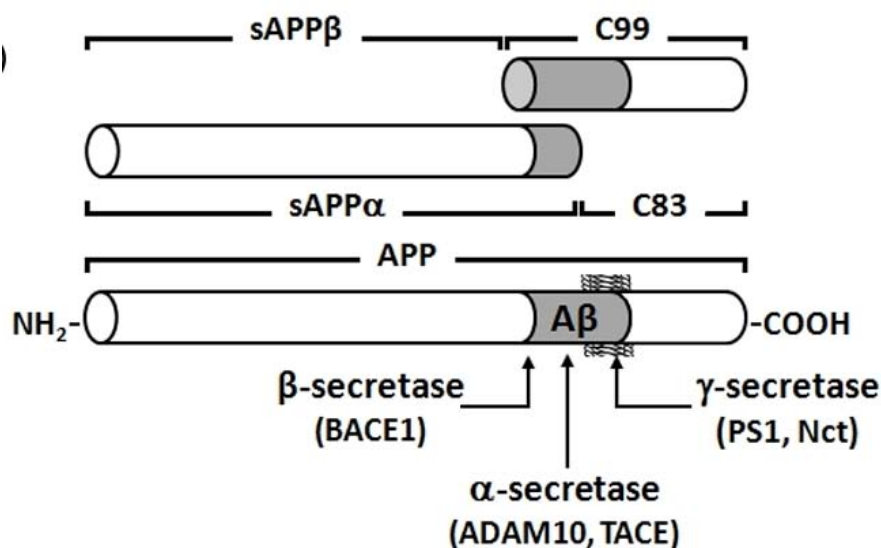
resultados previos y demostramos que concomitantemente al incremento del procesamiento amiloidogénico de la PPA, existe una disminución en la participación de la vía no amiloidogénica, a través de un decremento en la expresión de enzimas con actividad de  $\alpha$ -secretasa. El procesamiento no amiloidogénico, mediado por la  $\alpha$ -secretasa, previene la formación de  $A\beta$ ; contrariamente, una reducción en su actividad podría causar un incremento en la producción de  $A\beta$ . Como se mencionó previamente, ADAM10 parece ser responsable de la actividad constitutiva así como de la inducible, mientras que TACE presenta actividad de  $\alpha$ -secretasa inducible (Buxbaum *et al.*, 1998). En el presente estudio demostramos que bajo condiciones de estrés oxidante, la forma madura (enzimáticamente activa) de TACE exhibe una importante reducción en los niveles proteicos asociado con el decremento de los niveles de la sPPA $\alpha$ . En este contexto, ha sido reportado recientemente que células de neuroblastoma que presentan un ligero incremento en los niveles de TACE muestran un efecto robusto al disminuir los niveles de  $A\beta$  (Tachida *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha reportado que la actividad de  $\alpha$ -secretasa aumenta en células neuronales expuestas al compuesto antioxidante miricetina (Shimmyo *et al.*, 2008). Tomando en conjunto las evidencias anteriores y los hallazgos que presentamos, podemos concluir que los cambios observados en el presente trabajo podrían ser suficientes para disminuir el procesamiento no amiloidogénico de la PPA, esto último apoyado por la reducción en los niveles del fragmento neurotrófico sPPA $\alpha$  (producto del metabolismo no amiloidogénico, ver Esq. 2).

Las condiciones pro-oxidantes usadas en el presente estudio, también inducen una regulación positiva de la  $\gamma$ -secretasa, como lo muestran el incremento significativo en los niveles de la proteína presenilina 1, la cual posee la actividad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa, mientras que los niveles de nicastrina, cuyo papel es la estabilización de dicho complejo, no se ven alterados bajo estas condiciones. En este sentido, evidencia previa muestra que el estrés oxidante regula de manera positiva la actividad de la  $\gamma$ -secretasa (Tamagno *et al.*, 2008a; Shen *et al.*, 2008), pero nuestros datos demuestran específicamente, que la presenilina1 podría estar particularmente

involucrada en dicho efecto, bajo condiciones pro-oxidantes. Por otro lado, la proteína BACE1, con altos niveles de expresión en neuronas, parece ser la principal enzima con actividad de  $\beta$ -secretasa y el paso limitante en la producción de A $\beta$ . Siguiendo esta secuencia, la acción de la  $\beta$ -secretasa sobre la PPA conduce a la generación del fragmento proteolítico C99, el cual es procesado posteriormente por la  $\gamma$ -secretasa concluyendo con la generación de A $\beta$  (ver Esq. 2). Hasta este momento, no se han detectado mutaciones en la proteína BACE en los casos de tipo familiar de la EA (Cruts *et al.*, 2001; Nicolaou *et al.*, 2001), sin embargo, han sido reportados aumentos en los niveles de expresión de BACE1 en la corteza de paciente con la EA de tipo esporádico (Holsinger *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). Los mecanismos implicados en esta elevación de los niveles de BACE en algunos casos de EA de tipo esporádico se desconocen hasta el momento. En diversos trabajos se ha examinado el papel de vías activadas por estrés sobre la elevación de BACE (Tong *et al.*, 2005; Tamagno *et al.*, 2005, 2008a). En concordancia con estos reportes, nosotros observamos un incremento en los niveles de BACE1 como lo revelan los estudios por western-blot e inmunohistiquímica. Adicionalmente, a partir del estudio de la presencia de fosfoepítipo Thr668, observamos una acumulación del fragmento fosforilado C99, el cual indica un gran procesamiento de la PPA principalmente dirigido por BACE1.

El principal sitio de fosforilación de la PPA es la Thr668, localizada en la región citoplasmática. De manera fisiológica, la fosforilación de la PPA en la Thr668 se observa en neurona en división, así como en células bajo estrés. Concomitante a la regulación diferencial de los niveles proteicos de las distintas secretasas, nosotros encontramos evidencias de que el aumento en la fosforilación de la Trh668 esta mediada por la cinasa JNK durante la exposición a un estado de estrés oxidante, y esta fosforilación podría participar en el corte endoproteolítico de la PPA mediado por BACE1. La inhibición farmacológica de la cinasa JNK bloquea la fosforilación de la Thr668, además de revertir la reducción en los niveles de PPA y sPPA $\alpha$ . Estos resultados sustentan la participación de la cinasa JNK en la generación de A $\beta$  mediada por la vía amiloidogénica. Aunque existe controversia en este punto, ya que ciertas evidencias

ligan la fosforilación en la Thr668 de la PPA con los niveles de A $\beta$  (Ando *et al.*, 2001; Lee HG *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2005), otros reportes no encuentran que esta fosforilación este mecanísticamente ligada a la producción de A $\beta$  (Sano *et al.*, 2006). En este sentido, Shin *et al.* (2007) propusieron la probable existencia de dos alternativas en el procesamiento de la PPA, una dependiente de la fosforilación de la Thr668 y otra independiente de esta para la generación de A $\beta$ . Sin embargo, en el presente trabajo encontramos una gran acumulación del fragmento endoproteolítico C99, el cual se hallaba fosforilado en la Thr668. El papel de este fragmento, generado por la acción de BACE1, es el principal responsable del procesamiento pro-amiloidogénico de la PPA durante el estrés oxidante.

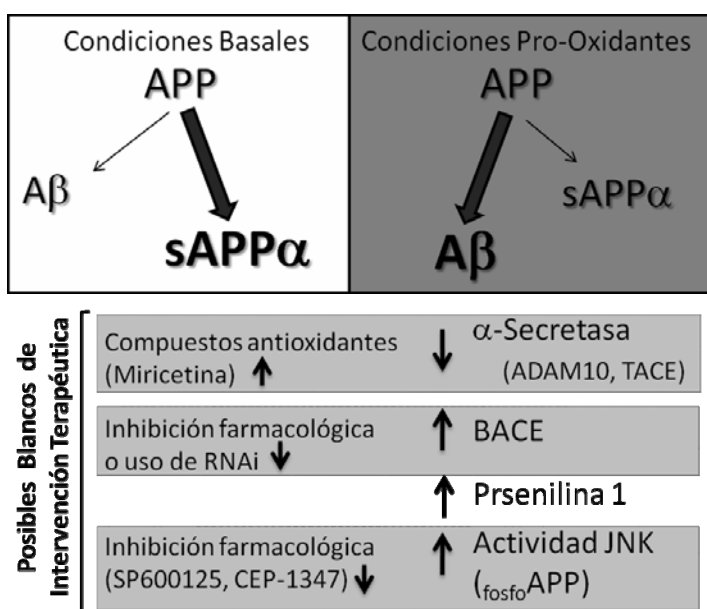


**Esq. 2 Representación de los distintos productos generados a partir del metabolismo de la PPA.** La PPA es una glucoproteína transmembranal que puede ser procesada a través de dos vías: la amiloidogénica y la no amiloidogénica. Bajo condiciones metabólicas normales aproximadamente el 90% de la PPA es procesada por la vía no amiloidogénica, generándose el fragmento sPPA $\alpha$  debido a la acción de la  $\alpha$ -secretasa en la membrana celular previniendo así la formación de A $\beta$ . Alternativamente, en la vía amiloidogénica, el A $\beta$  es generada por el procesamiento secuencial de la  $\beta$ - y la  $\gamma$ -secretasa, las cuales producen las regiones N- y C-terminal respectivamente.



En resumen, los resultados del presente trabajo complementan otros reportes recientes y agregan nuevos datos sobre el papel del estrés oxidante en el procesamiento amilodogénico de la PPA humana silvestre en células de neuroblastoma, el cual desencadena una regulación negativa de las enzimas con actividad de  $\alpha$ -secretasa, así como una regulación positiva de la  $\gamma$ -secretasa y en particular de la  $\beta$ -secretasa, dependientes de la activación de la cinasa JNK.

En conjunto, la evidencia experimental obtenida en el presente trabajo sugiere fuertemente la posibilidad de utilizar estrategias farmacológicas encaminadas a contrarrestar la actividad bien sea de la  $\beta$ -secretasa, la enzima limitante en la generación de  $A\beta$  o de la actividad de JNK (ver Esq. 3). En este sentido algunos autores han propuesto la inhibición de la cinasa JNK como un blanco farmacológico en el tratamiento de algunas enfermedades. Incluso el uso del inhibidor SP600125, que fue utilizado por nosotros en el presente trabajo, se ha reportado con éxito en el tratamiento de artritis reumatoide en modelos animales (Han *et al.*, 2001). De manera específica la inhibición de la cinasa JNK3, se ha propuesto en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, así como en la prevención de la muerte neuronal en casos de infartos cerebrales (Bogoyevitch *et. al.*, 2004).



**Esq. 3 Posibles blancos para el control de la amiloidosis en la EA.** Condiciones pro-oxidantes propician la generación de  $A\beta$  a través de la modulación diferencial de las enzimas involucradas en el procesamiento de la PPA. En este contexto, los compuestos capaces de aumentar los niveles de enzimas con actividad de  $\alpha$ -secretasa son de interés en el tratamiento de la EA. También la intervención farmacológica sobre blancos como la proteína BACE o la cinasa JNK, usado en este trabajo (SP600125), podrían ser de utilidad terapéutica.

Aunque inicialmente analizamos un número mayor condiciones capaces de influir en la producción de A $\beta$ , tales como la cafeína y el Cu<sup>2+</sup> y cuya presencia se ha documentado en la EA (Lee RK *et al.*, 1999; Strausak *et al.*, 2001), en nuestro modelo parecieran no alterar de manera significativa el metabolismo de la PPA. Sin embargo, se sabe que otras condiciones del metabolismo alterado en las células de neuroblastoma humano como la dishomeostasis del calcio interno podrían también ejercer un efecto similar al del estrés oxidante alterando el metabolismo de la PPA. Aunque no exploramos más esta posibilidad en los cultivos celulares sometidos a diferenciación, los experimentos con cafeína merecerían un estudio más profundo con el fin de corroborar estos resultados, usando ya sean rianodina o agonistas adrenérgicos con el fin de tener efectos más específicos. Esto, debido a que la concentración de cafeína utilizada (5mM) se sabe que activa al receptor de rianodina e induce una liberación de calcio de pozas internas además de inhibir la acción de la fosfodiesterasa, lo cual podría permitir una elevación en los niveles de AMPc (Lee RK *et al.*, 1999). En este sentido, existen algunos reportes epidemiológicos los cuales indican que situaciones capaces de aumentar de manera crónica la concentración de adrenalina o noradrenalina favorecen el desarrollo de la EA.

Con respecto al Cu<sup>2+</sup>, aunque no detectamos cambios importantes en el metabolismo de la PPA, se ha reportado altas concentraciones de éste metal dentro de las placas seniles, siendo capaz de interactuar con el A $\beta$ , al igual que el Fe<sup>2+</sup>, promoviendo su agregación y potenciando el estrés oxidante asociado a la formación de placas amiloideas (Huang *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1997). También se ha propuesto a la PPA como un transportador específico de cobre el cual posee la capacidad reducirlo y permitir su utilización biológica (Ruiz *et al.*, 1999). De esta manera aunque en nuestro modelo el Cu<sup>2+</sup> no parece no alterar el metabolismo de la PPA, podría participar en el proceso de agregación del A $\beta$  generado.

---

### XIII. CONCLUSIONES GENERALES

---

- La inducción de un estado de estrés oxidante, promovido por exposición a  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$  (determinado por un aumento en la generación de ERO) fue capaz de alterar el procesamiento normal de la PPA, en células de neuroblastoma humano MSN, tanto en un estado indiferenciado como después de inducir su diferenciación.
- Bajo estas condiciones se observó una disminución en los niveles de PPA y sPPA $\alpha$  concomitante con un incremento en la generación de  $A\beta_{42}$ .
- En nuestro modelo, los tratamientos pro-oxidante tienen un efecto diferencial sobre las enzimas que participan en el metabolismo de la PPA.
- La exposición a  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$  disminuye los niveles de proteínas con actividad de  $\alpha$ -secretasa (ADAM10/TACE) involucradas en el procesamiento no amilodogénico de la PPA.
- El estrés oxidante regula positivamente la expresión de Presenilina 1 and BACE1, ambas involucradas en la generación de  $A\beta_{42}$ , a través del procesamiento amiloidogénico.
- La fosforilación del residuo de Thr668 de la PPA es un evento central en la generación de  $A\beta$ , la cual está mediada por la cinasa JNK.

#### XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham C.R., Selkoe D.J., Potter H. (1988) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor  $\alpha_1$ -antitrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52, 487-501.
- Akiyama H., Shin R. W., Uchida C., Kitamoto T., Uchida T. (2005) Pin1 promotes production of Alzheimer's amyloid  $\beta$  from  $\beta$ -cleaved amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 521-529.
- Alonso A.C., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* 2, 783-787.
- Alonso A.C., Zaidi T., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5562-5566.
- Alzheimer, A. (1907). Über einen eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin* 64, 146-148. (An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin. Anat.* (1995) 8, 429-31).
- Ando K, Iijima K. I., Elliott J. I., Kirino Y., Suzuki T. (2008) Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of  $\beta$ -amyloid. *J. Biol. Chem.* 276, 40353-40361.
- Arendt (2001) Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience* 102, 723-765.
- Arias C. (1999) Enfermedad de Alzheimer. En: *Enfermedades neurodegenerativas, Mecanismos celulares y Moleculares*. FCE, México D. F. p.p. 133-160.
- Asai M., Hattori C., Szabo B., Sasagawa N., Maruyama K., Tanuma S., Ishiura S. (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as PPA  $\alpha$ -secretase. *Biochem. Biophys. Res.* 301, 231-235.
- Behl C., Davis J. B., Lesley R., Schubert D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Cell* 77, 817-827.
- Behl C., Davis J., Cole G.M., Schubert D. (1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 944-950.
- Behl C., Moosmann B. (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic PPAroach. *Free. Radic. Biol. Med.* 33, 182-191.
- Behl C., Trapp T., Skutella T., Holsboer F. (1997) Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death-a novel role for RU486. *Eur. J. Neurosci.* 9, 912-920.
- Binder L.I., Frankfurter A., Rebhun L.I. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371-1378.
- Bogoyevitch M. A., Boehm I., Oakley A., Ketterman A. J., Barr R.K. (2004) Targeting

- the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta.* 1697, 89-101.
- Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J., Yankner B.A. (1995)  $\beta$ -amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron.* 4, 879-888.
- Butterfield D. A. (2002) Amyloid  $\beta$ -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* 36, 1307-1313.
- Butterfield D.A., Hensley K., Harris M., Mattson M., Carney J. (1994)  $\beta$ -amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 710-715.
- Buxbaum J. D., Liu K. N., Luo Y., Slack J. L., Stocking K. L., Peschon J.J., Johnson R. S., Castner B. J., Cerretti D. P., Black R. A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol Chem.* 273, 27765-27767.
- by its effect on the  $\alpha$ -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5815-5820.
- Caceres A., Potrebic S., Kosik K.S. (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J. Neurosci.* 6, 1515-1523.
- Carter J y Liapp CF (2001)  $\beta$ -amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Med.* 1, 733-737.
- Cataldo A.M., Nixon R.A. (1990) Enzymatically active lysosomal protease are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 3861-3685.
- Cecchi C., Fiorillo C., Sorbi S., Latorraca S., Nacmias B., Bagnoli S., Nassi P., Liguri G. (2002) Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1372-1379.
- Cooper A.J.L. (1997) Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. En: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Klunk LM, eds. *The molecular and genetic basis of neurological disease.* Boston: Butterworth-Heinemann, pp:1242-5.
- Copani A., Koh J.Y., Cotman C.W. (1991)  $\beta$ -Amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. *Neuroreport.* 2, 763-765.
- Cotman C.W., Pike C.J., Copani A. (1992)  $\beta$ -Amyloid neurotoxicity: a discussion of in vitro findings. *Neurobiol. Aging.* 13, 587-590.
- Coulson E.J., Paliga K., beyreuther K., Masters C.L. (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergen family tells us about its function. *Neurochem. Int.* 36, 175-184.
- Cruts M., Dermaut B., Rademakers R., Roks G., Van den Broeck M., Munteanu G., van Duijn C. M., Van Broeckhoven C. (2001) Amyloid  $\beta$  secretase gene (BACE) is neither mutated in

- nor associated with early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 313, 105-107.
- Davies M. (1994) Strategies for the development of therapeutics for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 15, 53-54.
- Delacourte A., Defossez A. (1986) Alzheimer's Disease: tau protein, the promoting factors of microtubule assembly are major components of paired helical filaments. *J. Neurosci.* 76, 173-186.
- Esler W. P., Wolfe M. S. (2001) A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293, 1449-1454.
- Floyd R.A., Hensley K. (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging.* 23, 795-807.
- Fluhrer R., Capell A., Westmeyer, G., Willem M., Hartung B., Condrón M.M., Teplow D.B., Haass C., Walter J. (2002) A nonamyloidogenic function of BACE-2 in secretory pathway. *J. Neurochem.*, 81, 1011-1020.
- Francis R., McGrath G., Zhang J., Ruddy D. A., Sym M., Apfeld J., Nicoll M., Maxwell M., Hai B., Ellis M. C., Parks A. L., Xu W., Li J., Gurney M., Myers R. L., Himes C. S., Hiebsch R., Ruble C., Nye J. S., Curtis D. (2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling,  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\beta$ PPA, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell.* 3, 85-97.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J.S., Curtis, D. (2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling,  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\beta$ APP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell.*, 3, 85-97.
- Frederikse P.H., Garland D., Zigler J.S. Jr., Piatigorsky J. (1996) Oxidative stress increases production of  $\beta$ -amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) in mammalian lenses, and  $A\beta$  has toxic effects on lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 10169-10174.
- Freir D.B, Holscher C, Herron C.E. (2001) Blockade of long-term potentiation by  $\beta$ -amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J. Neurophysiol.* 85, 708-713.
- Fukumoto H., Cheung B. S., Hyman B. T., Irizarry M. C. (2002)  $\beta$ -secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1381-1389.
- Gandy, S., Czernik, A. J., Greengard, P. (1988) Phosphorylation of Alzheimer disease amyloid precursor peptide by protein kinase C and  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6218-6221.
- Ghiso J., Rostagno A., Gardella J.E., Liem L., Gorevic P.D., Frangione B. (1992) A 109-amino acid C-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein contains a sequence, -RDSH-, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.* 288, 1053-1059.

- Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.C., Ulrich J., Crowther R.A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO. J.* 8, 393-399.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, V., Gadusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Scienze*, 235, 877-880.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 31, 45-80.
- Han Z., Boyle D. L., Chang L., Bennett B., Karin M., Yang L., Manning A. M, Firestein G. S. (2001) c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 108, 73-81.
- Hardy J. (2006) A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research. *Neuron* 52, 3-13.
- Hardy J. (2006) Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr. Alzheimer Res.* 3, 71-73.
- Harkany T., Abrahám I., Kónya C., Nyakas C., Zarándi M., Penke B., Luiten P.G. (2000) Mechanisms of  $\beta$ -amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev. Neurosci.* 11, 329-382.
- Hartmann H., Eckert A. And Muller W. E. (1993)  $\beta$ -amyloid protein amplifies calcium signaling in central neurons from the adult mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:, 216-220.
- Hazel J.R., Williams E.E. (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid. Res.* 29, 167-227.
- Hebert L.E., Scherr P.A., Bienias J.L. (2003) Alzheimer disease in the US population: Prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurology.* 60, 1119-22.
- Hernández-Ortega K., Ferrera P., Arias C. (2007) Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J. Neurosci. Res.* 85, 1744-1751.
- Holsinger R. M., McLean C.A., Beyreuther K., Masters C.L., Evin G. (2002) Increased expression of the amyloid precursor  $\beta$ -secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 51, 783-786.
- Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., Yang F., Cole G. (1996) Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.

- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., Bush, A.I. (1999) Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J. Biol. Chem.* 274, 3711-3716.
- Iijima, K., Ando, K., Takeda, S., Satoh, Y., Seki, T., Itohara, S., Greengard, P., Kirino, Y., Nairn, A. C., Suzuki, T. (2000) Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* 75, 1085-1091.
- Iqbal K., Grundke-Iqbal. (1991) Alzheimer's Disease: from cytoskeletal protein pathology to neuronal degeneration. In *Alzheimer's Disease: basic Mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies.*(Iqbal K., McLachlan DCR., Winbland B., Wisnieswski HE ed) Wile, England. Pag. 173.
- Kaido M., Fujimura H, Soga F, Toyooka K, Yoshikawa H, Nishimura T, Higashi T, Inui K, Imanishi H, Yorifuji S, Yanagihara T. (1996) Alzheimer-type pathology in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Acta Neuropathol.* 92, 312-318.
- Kang D.E., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik KH. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197,92-93.
- Kimberly W. T., Zheng J. B., Town T., Flavell R. A., Selkoe D. J. (2005) Physiological regulation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation. *J. Neurosci.* 25, 5533-5543.
- Knops J., Kosik KS., Lee G., Pardee J., Cohen-Gould L., McConologue L. (1991) Overexpression of tau in non-neuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell. Biol.* 114, 725-733.
- Knops, J., Gandy, S., Greengard, P., Lieberburg, I., Sinha, S. (1993) Serine phosphorylation of the secreted extracellular domain of APP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 380-385.
- Kojro E., Gimpl G., Lammich S., Marz W., Fahrenholz F. (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway
- Ksiezak-Reding H., Liu W.K., Yen Sh. (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 597, 209-219.
- Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., Roher, A.E. (1996) Water-soluble A $\beta$  (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 271, 4077-4081.
- Lammich S., Kojro E., Postina R., Gilbert S., Pfeiffer R., Jasionowski M., Haass C., Fahrenholz F. (1999) Constitutive and



- regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3922-3927.
- Lee H. G., Castellani R. J., Zhu X., Perry G., Smith M. A. (2005) Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease: the horse or the cart? Pathogenic or protective? *Int. J. Exp. Pathol.* **86**, 133-138.
- Lee R.K., Knapp S., Wurtman R.J. (1999) Prostaglandin E2 stimulates amyloid precursor protein gene expression: inhibition by immunosuppressants. *J. Neurosci.* **19**, 940-947.
- Lee V. M., Quinn P.A., Jennings S.C. (2003) NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* **41**, 925-931.
- Lemere C. A., Lopera F., Kosik K. S., Lendon C. L., Ossa J., Saido T. C., Yamaguchi H., Ruiz A., Martinez A., Madrigal L., Hincapie L., Arango J. C., Anthony D. C., Koo E. H., Goate A. M., Selkoe D. J., Arango J. C. (1996) The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A $\beta$ 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat. Med.* **2**, 1146-1150.
- Levy-Lahad E., Wijsman E. M., Nemens E., Anderson L., Goddard K. A., Weber J. L., Bird T.D., Schellenberg G.D. (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* **269**, 970-973.
- Lichtenthaler S.F., Wang R., Grimm H., Uljon S.N., Masters C.L., Beyreuther K. (1999) Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease  $\gamma$ -secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3053-3058.
- Lockhart B.P., Benicourt C., Junien, J.L., Privat A. (1994) Inhibitors of free radical formation fail to attenuate direct  $\beta$ -Amyloid 25-35 peptide-mediated neurotoxicity in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* **39**, 494-505.
- Löschner W. (1985) Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: Electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effect on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *J. Neurochem.* **45**, 879-889.
- Lowry OH., Rosenbrough NJ., Farr AL., Randal RJ. (1951) Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- mammalian development. *Science*, **282**, 1281-1284.
- Markesbery W.R., Carney J.M. (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **9**, 133-146.
- Marlow L., Canet R. M., Haugabook S. J., Hardy J. A., Lahiri D. K., Sambamurti K. (2003) APH1, PEN2, and Nicastrin increase A $\beta$  levels and  $\gamma$ -secretase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 502-509.
- Martin L.J., Sisodia S.S., Koo E.H., Cork L.C., Dellovade T.L., Weidemann A., Beyreuther K., Masters C., Price D.L. (1991) Amyloid precursor protein in aged nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 1461-1465.

- Masliah E., Terry R.D., Alford M., De Teresa R. and Hansen L.A. (1991) Cortical and subcortical patterns of synaptophysin-like immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 138, 235-246.
- Matsui T., Ingelsson M., Fukumoto H., Ramasamy K., Kowa H., Frosch M. P., Irizarry M. C., Hyman B. T. (2007) Expression of PPA pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain. Res.* 1161, 116-123.
- Mattson M.P., Cheng B., Davis D., Bryant K., Lieberburg I. and Rydel RE. (1992)  $\beta$ -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 376-389.
- Miller D.L., Papayannopoulos I.A., Styles J., Bobin S.A., Lin Y.Y., Bieman K., Iqbal K. (1993) Peptide composition of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch. Biochem Biophys.* 301, 40-52.
- Minopoli G., de Candia P., Bonetti A., Faraonio R., Zambrano N., Russo T. (2001) The  $\beta$ -amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 6545-6550.
- Misonou H., Morishima-Kawashima M., Ihara Y. (2000) Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry.* 39, 6951-6959.
- Montine T. J., Montine K. S., McMahan W., Markesbery W. R., Quinn J. F., Morrow J. D. (2005) F2-isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 269-275.
- Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.
- Nakaya, T., Suzuki, T. (2006) Role of APP phosphorylation in FE65-dependent gene transactivation mediated by AICD. *Genes Cells* 11, 633-645.
- Namba Y., Tomonaga M., Kawasaki H., Otomo E., Ikeda K. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jahob disease. *Brain res.* 541, 163-166.
- Nicolaou M., Song Y. Q., Sato C. A., Orlacchio A., Kawarai T., Medeiros H., Liang Y., Sorbi S., Richard E., Rogaev E. I., Moliaka Y., Bruni A. C., Jorge R., Percy M., Duara R., Farrer L. A., St Georg-Hyslop P., Rogaeva E.A. (2001) Mutations in the open reading frame of the  $\beta$ -site PPA cleaving enzyme (BACE) locus are not a common cause of Alzheimer's disease. *Neurogenetics* 3, 203-206.
- Ninomiya H., Roch J.M., Sundsmo M.P., Otero DA., Saitoh T. (1993) Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid  $\beta/A4$  protein precursor that promotes fibroblast growth. *J. Cell Biol.* 121, 1213-1221.
- Nishimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Takahashi S., Okamoto T., Murayama Y.

- (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein Go. *Nature* 362, 75–79.
- Nordstedt C., Caporaso GL., Thyberg J., Gandy S.E., Greengard P. (1993) Identification of the Alzheimer  $\beta$ /A4-amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol. Chem.* 268, 608–612.
- Nunomura A., Castellani R. J., Zhu X., Moreira P. I., Perry G., Smith M. A. (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 631-641.
- Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E. K., Jones P. K., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwood C. S., Petersen R. B., Smith M. A. (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 759-767.
- Nunomura A., Perry G., Pappolla M. A., Wade R., Hirai K., Chiba S., Smith M.A. (1999) RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 19, 1959-1964.
- Paola D., Domenicotti C, Nitti M, Vitali A, Borghi R, Cottalasso D, Zaccheo D, Odetti P, Strocchi P, Marinari UM, Tabaton M, Pronzato MA. (2000) Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid  $\beta$ -protein production and selective activation of  $\beta$ I and  $\beta$ II PKCs in NT2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 642-646.
- Pappolla M.A., Omar R.A., Kim K.S., Robakis N.K. (1992) Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 140, 621-627.
- Parvathy S., Hussain I., Karran E. H., Turner A. J., Hooper N. M. (1998) Alzheimer's amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase. *Biochemistry* 37, 1680- 1685.
- Perry G., Nunomura A, Hirai K, Takeda A, Aliev G, Smith M.A. (2000) Oxidative damage in Alzheimer's disease: the metabolic dimension. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 417-421.
- Peschon J.J., Slack J.L., Reddy P., Stocking K.L., Sunnarborg S.W., Lee D.C., Russell W.E., Castner B.J., Johnson R.S., Fitzner J.N., Boyce R.W., Nelson N., Kozlosky C.J., Wolfson M.F., Rauch C.T., Cerretti D.P., Paxton R.J., March C.J., Black R.A. (1998) An essential role for ectodomain shedding in
- Praticò D., Clark C. M., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Rokach J., FitzGerald G.A. (2000) Increased 8,12-iso-iPF<sub>2</sub>alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann. Neurol.* 48, 809-812.
- Praticò D., Uryu K., Leight S., Trojanowski J. Q., Lee V.M. (2001) Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J. Neurosci.* 21, 4183-4187.
- Price D.L., Sisodia,S.S. (1998) Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.*, 21, 479-505.

- Ramelot, T. A., Gentile, L. N., Nicholson, L. K. (2000) Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors. *Biochemistry* 39, 2714–2725.
- Reynolds C. P., Biedler J. L., Spengler B. A. (1986) Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 375–387.
- Rogaev E. I., Sherrington R., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Liang Y., Chi H., Lin C., Holman K., Tsuda T. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775-778.
- Rosen R.F., Farberg A.S., Gearing M., Dooyema J., Long P.M., Anderson D.C., Davis-Turak J., Coppola G., Geschwind D.H., Pare J.F., Duong T.Q., Hopkins W.D., Preuss T.M., Walker L.C. (2008) Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J Comp Neurol* 509, 259–270.
- Rossonjohn J., CaAPPi R., Feli SC, Henry A., McKinstry W.J., Galatis D. (1999) Crystal structure of the N-terminal growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat. Struct. Biol.* 6, 327-331.
- Ruiz F. H., González M., Bodini M., Opazo C., Inestrosa N. C. (1999) Cysteine 144 is a key residue in the copper reduction by the beta-amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 73, 1288-1292.
- Saido T. C., Yokota M., Maruyama K., Yamao-Harigaya W., Tani E., Ihara Y., Kawashima S. (1994) Spatial resolution of the primary  $\beta$ -amyloidogenic process induced in postischemic hippocampus. *J. Biol. Chem.* 269, 15253-15257.
- Sano Y., Nakaya T., Pedrini S., Takeda S., Iijima-Ando K., Iijima K., Mathews P. M., Itohara S., Gandy S., Suzuki T. (2006) Physiological mouse brain A $\beta$  levels are not related to the phosphorylation state of threonine-668 of Alzheimer's PPA. *PLoS ONE.* 20, e51.
- Satou T., Cummings B.J., Head E., Nielson K.A., Hahn F.F., Milgram N.W., Velazquez P., Cribbs D.H., Tenner A.J., Cotman C.W. (1997) The progression of  $\beta$ -amyloid deposition in the frontal cortex of the aged canine. *Brain Res.* 774, 35–43.
- Sayre L.M., Perry G., Harris P.L., Liu Y., Schubert K.A., Smith M.A. (2000) In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem* 74, 270-279.
- Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T. D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S.. (1996) Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and PPA mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864-870.

- Selkoe D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741-766.
- Selkoe D. J. (2003) Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem. Res.* 28, 1705-1713.
- Selkoe D.J. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487-498.
- Seubert P., Oltersdorf T., Lee MG, Barbour R., Blomquist C., Davis DL., (1993) Secretion of  $\beta$ -amyloid precursor protein cleaved at the amino-terminus of the  $\beta$ -amyloid peptide. *Nature* 361, 260–263.
- Shen C., Chen Y., Liu H., Zhang K., Zhang T., Lin A., Jing N. (2008) Hydrogen peroxide promotes A $\beta$  production through JNK-dependent activation of  $\gamma$ -secretase. *J. Biol. Chem.* 283, 17721-17730.
- Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.
- Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A., Niidome T., Sugimoto H. (2008) Multifunction of myricetin on A $\beta$ : neuroprotection via a conformational change of A $\beta$  and reduction of A $\beta$  via the interference of secretases. *J. Neurosci. Res.* 86, 368-377.
- Shin R. W., Ogino K., Shimabuku A., Taki T., Nakashima H., Ishihara T., Kitamoto T. (2007) Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Thr668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of A $\beta$  and tau. *Acta Neuropathol.* 113, 627-636. *Antioxid Redox Signal.* 2, 413-420.
- Smith M. A., Harris P. L., Sayre L. M., Perry G. (1997) Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9866-9868.
- Smith M.A. Rudnicka-Nawrot M., Richey P.L., Praprotnik D., Mulvihill P., Miller C.A., Sayre L.M., Perry G. (1995) Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 64, 2660–2666.
- Smith M.A., Nunomura A., Zhu X., Takeda A., Perry G. (2000) Metabolic, metallic, and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease.
- Smith-Swintosky V.L., Zimmer S., Fenton J.W., Mattson M. (1995) Opposing actions of thrombin and protease nexin-1 on amyloid  $\beta$ -peptide toxicity and on accumulation of peroxides and calcium in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65, 1415–1418.
- Snow A.D., Henderson M., Nochlin D., Sekiguchi RT., Kimata K., Koike Y., Wight T.N. (1990) Early accumulation of heparin sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein containing lesions of Alzheimer disease and Down's syndrome. *Am. J. Pathol.* 137, 1253-1267.

- Stéphan A., Davis S., Salin H., S., Mallet J., Laroche S. (2002) Age-Dependent Differential Regulation of Genes Encoding APP and  $\alpha$ -Synuclein in Hippocampal Synaptic Plasticity. *Hippocampus* 12, 55-62.
- Stephenson D. T., Clemens J. A. (1998) Metabotropic glutamate receptor activation in vivo induces intraneuronal amyloid immunoreactivity in guinea pig hippocampus. *Neurochem. Int.* 33, 83-93.
- Strausak D., Mercer J.F., Dieter H.H., Stremmel W., Multhaup G. (2001) Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Research Bulletin* 55, 175-185.
- Subramaniam R., Roediger F., Jordan B., Mattson M.P., Keller J.N., Waeg G, Butterfield D.A. (1997) The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *J. Neurochem.* 69, 1161-1169.
- Suzuki T., Nakaya T. (2008) Regulation of PPA by phosphorylation and protein interactions. *J. Biol. Chem.* Article in Press
- Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C., Greengard, P. (1994) Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 1114-1122.
- Tachida Y., Nakagawa K., Saito T., Saido T. C., Honda T., Saito Y., Murayama S., Endo T., Sakaguchi G., Kato A., Kitazume S., Hashimoto Y. (2008) Interleukin-1 $\beta$  up-regulates TACE to enhance  $\alpha$ -cleavage of PPA in neurons: resulting decrease in A $\beta$  production. *J. Neurochem.* 104, 1387-1393.
- Tamagno E., Guglielmotto M., Aragno M., Borghi R., Autelli R., Giliberto L., Muraca G., Danni O., Zhu X., Smith M. A., Perry G., Jo D. G., Mattson M. P., Tabaton M. (2008a) Oxidative stress activates a positive feedback between the  $\gamma$ - and  $\beta$ -secretase cleavages of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 104, 683-695.
- Tamagno E., Guglielmotto M., Giliberto L., Vitali A., Borghi R., Autelli R., Danni O., Tabaton M. (2008b) JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1. *Neurobiol. Aging.* Article in Press.
- Tamagno E., Parola M., Bardini P., Piccini A., Borghi R., Guglielmotto M., Santoro G., Davit A., Danni O., Smith M. A., Perry G., Tabaton M. (2005)  $\beta$ -site PPA cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J. Neurochem.* 92, 628-636.
- Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A.B., St. George-Hyslop, P.H., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., Neve, R.L. (1987) Amyloid  $\beta$ -protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235, 880-884.
- Terry RD., Katzman R. (2000) Life span synapses will there be a primary senile dementia?. *Neurobiol of aging.* 22, 347-348.
- Tienari P.J., Ida N., Ikonen E., Simons M., Weidemann A., Multhaup G. (1997)

- Intracellular and secreted Alzheimer  $\beta$ -amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4125–4130.
- Tong X. K., Nicolakakis N., Kocharyan A., Hamel E. (2005) Vascular remodeling versus amyloid  $\beta$ -induced oxidative stress in the cerebrovascular dysfunctions associated with Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 25, 11165-11174.
- van Broeckhoven, Backhovens H., Cruts M., De Winter G., Bruylant M., Cras P., Martin J.J. (1992) Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. *Nat. Genet.* 2,335–339.
- Vassar R., Bennett B. D., Babu-Khan S., Khan S., Mendiaz E. A., Denis P., Teplow D. B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jorosinski M. A., Biere A. L., Curran E., Burgess T., Louis J. C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M. (1999)  $\beta$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.
- Velliquette R. A., O'Connor T., Vassar R. (2007) Energy inhibition elevates  $\beta$ -secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in PPA transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.* 25, 10874-10883.
- Vigo-Pelfrey, C., Lee, D., Keim, P., Leiberburg, I., Schenk, D.B. (1993) Characterization of  $\beta$ -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 61, 1965–1968.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181-193.
- Wang H.W., Pasternak J.F., Kuo H., Ristic H., Lambert M.P., Chromy B., Viola K.L., Klein W.L., Stine W.B., Krafft G.A., Trommer B.L. (2002) Soluble oligomers of  $\beta$  amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain. Res.* 924, 133-140
- Wen C., Metzstein M.M., Greenwald I. (1997) SUP-17, a Caenorhabditis elegans ADAM protein related to Drosophila KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development*, 124, 4759-4767.
- White A.R., Multhaup G., Maher F., Bellingham S., Camakaris J., Zheng H., Bush A.I., Beyreuther K., Masters C.L., Cappai R. (1999) The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *J Neurosci.* 19, 9170-9179.
- Wischik C.M., Novark M., Edwards P.C., Klug A., Tichelaar W., Crowther R.A. (1988) Structure and characterization of the core of the helical paired filaments of Alzheimer Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4884–4888.
- Wisniewski H.M., Narang H.K., Terry R.D. (1976) Neurofibrillary tangles of helical paired filaments. *J. Neurol. Sci.* 27,173-181.
- Wolfe M. S., Xia W., Ostaszewski B. L., Diehl T. S., Kimberly W. T., Selkoe D. J. (1999) Two

- transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* 398, 513–517.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrikson, R.L., Gurney, M.E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, **402**, 533-537.
- Yang L. B., Lindholm K., Yan R., Citron M., Xia W., Yang X. L., Beach T., Sue L., Wong P., Price D., Li R., Shen Y. (2003) Elevated  $\beta$ -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* 9, 3-4.
- Yankner B.A., (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*. 16, 921-932
- Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y. Q., Rogaeva E., Chen F., Kawarai T., Supala A., Levesque L., Yu H., Yang D. S., Holmes E., Milman P., Liang Y., Zhang D. M., Xu D. H., Sato C., Rogaev E., Smith M., Janus C., Zhang Y., Aebbersold R., Farrer L. S., Sorbi S., Bruni A., Fraser P., St George-Hyslop P. (2000) Nicastrin modulates presenilin-mediated *notch/glp-1* signal transduction and  $\beta$ PPA processing. *Nature* 407, 48-54.





## \_\_\_\_\_ XV. ARTÍCULOS DERIVADOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN \_\_\_\_\_

- Quiroz-Baez R., Montiel T., Hernández-Ortega K., Ferrera P., Massieu L. and Arias C. Amyloid  $\beta$ -protein metabolism and toxicity: role of oxidative stress. *New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies*, 2007 Capitulo 8. ISBN: 81-308-0164-7

Research Signpost  
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



New Perspectives on Brain Cell Damage, Neurodegeneration and Neuroprotective Strategies, 2007: ISBN: 81-308-0164-7  
Editors: Abel Santamaría and María Esther Jiménez-Capdeville

# 8

## Amyloid- $\beta$ protein metabolism and toxicity: Role of oxidative stress

Ricardo Quiroz-Baez<sup>1</sup>, Teresa Montiel<sup>2</sup>, Karina Hernández-Ortega<sup>1</sup>  
Patricia Ferrera<sup>1</sup>, Lourdes Massieu<sup>2</sup> and Clorinda Arias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México AP 70-228, México; <sup>2</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-600, México

### Abstract

*The pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is complex and may involve multiple etiological factors but a central role has been recognized for amyloid- $\beta$  protein ( $A\beta$ ) based on genetic, neuropathological and biochemical evidence. In addition to the well-documented role of  $A\beta$  in AD, extensive data from patients and in vivo animal models indicate that oxidative stress is one of the cardinal and most*

Correspondence/Reprint request: Dr. Clorinda Arias, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México AP 70228, México DF 04510, México. E-mail: carias@servidor.unam.mx

*frequent factors associated with this neurodegenerative dementia. Several investigations have revealed the presence of oxidation products from proteins, lipids, and DNA in postmortem tissue of AD patients, which is indicative of increased oxidative stress. However, at present a controversy has arisen regarding if oxidative stress is a consequence rather than a cause of the detrimental effects of A $\beta$  on neurons. The present review is a brief outline of one key mechanism involved in the pathological cascade of AD: free radical generation and its role in amyloid precursor protein (APP) metabolism and in the A $\beta$ -induced mechanisms associated with neuronal death.*

## **Introduction**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive and irreversible loss of memory and other cognitive functions. Substantial evidence based on genetic, neuropathological and biochemical data has established the central role of amyloid- $\beta$  protein (A $\beta$ ) in this pathology [1]. Although the precise etiology of AD is not well understood yet, strong evidence for some of the molecular events that lead to progressive brain dysfunction and neurodegeneration in AD has been afforded by the identification of biochemical pathways implicated in the generation of A $\beta$ , the development of transgenic models that exhibit the progressive disease pathology and by data on the effects of A $\beta$  on neuronal function. Increase in free radical generation has been associated with aging and appears to be involved in A $\beta$  generation as well as in its toxicity. Moreover, oxidative stress seems to be mechanistically linked with other features associated with neuronal death in AD, namely, metabolic, mitochondrial, metal, and cell-cycle abnormalities [2].

## **Oxidative stress and AD**

One of the major insults to brain during aging is oxidative stress, which is often associated with the lack of protection against the cellular generation of reactive oxygen species (ROS). These ROS cause oxidative damage to nucleic acids, carbohydrates, proteins, and lipids. Oxidative damage is particularly detrimental to the brain, where the neuronal cells are largely post-mitotic. The brain is especially susceptible to oxidative stress because it consumes 20% of the total body oxygen. Besides, brain is enriched with peroxidizable polyunsaturated fatty acids and has very low level of catalase activity and only moderate amounts of the endogenous antioxidant enzymes, superoxide dismutase and glutathione peroxidase [3]. Additionally, the brain has high levels of iron and ascorbate, which are the key catalysts for lipid peroxidation.

The term ROS is used to describe free radicals derived from molecular oxygen. Oxygen reduction by one electron produces relatively stable

intermediates. The superoxide anion ( $O_2^{\bullet -}$ ), the product of oxygen that is reduced by one electron, is the precursor of most ROS. Spontaneous or catalytic dismutation of  $O_2^{\bullet -}$ , produces hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which may be partially reduced to a hydroxyl radical ( $\bullet OH$ ), one of the strongest oxidant molecules. Additionally,  $O_2^{\bullet -}$  may react with other radicals, including nitric oxide ( $\bullet NO$ ), resulting in peroxynitrite, which is also a very powerful oxidant [4].

Accumulation of endogenous oxidative stress products seems to contribute to chronic diseases of the CNS such as Amyotrophic Lateral Sclerosis, Huntington's disease, Parkinson's disease and AD. Although it has not been demonstrated that oxidative stress is the ultimate cause of any of these diseases, accumulation of oxidative stress products participates at least in their development and symptoms.

In patients with AD, a relation between the state of oxidative products and cerebral damage exists and wide experimental evidence supports the importance of oxidative stress in the pathogenesis of this disease. Some of these observations are:

- a) increased levels of the oxidation of nucleic acids, proteins and lipids in the brain of AD's patients [5, 6];
- b) high concentrations of Fe (III) and Cu (II) in amyloid plaques. Both metals interact with  $A\beta$  promoting its aggregation and enhancing metal-catalyzed oxidative stress associated with amyloid plaque formation [7, 8];
- c) increased intracellular deposits of advanced glycation end products (AGES) which colocalize with intracellular neurofibrillary tangles (composed by hyperphosphorylated tau), frequently conjugated to the proteasome component, ubiquitin. A possible role of AGES in the induction of hyperphosphorylated tau has been proposed [9, 10];
- d) induction of cellular oxidative stress by  $A\beta$  in animal models and in cultured neurons [6].

Other studies have detected increased levels of products of lipid peroxidation, such as isoprostanes in plasma and in the brain of AD patients and in transgenic mice that overexpress mutated human APP [11-14]. In addition, Cecchi et al., [15] showed raised levels of malondialdehyde (MDA), and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in fibroblasts and lymphoblasts of familial AD patients. Moreover, the accumulation of ROS seems to be associated with neuritic plaques [16] and, in cultured neurons,  $A\beta_{1-42}$ -induced cell death was correlated with an increase in protein oxidation (protein carbonyl, 3-nitrotyrosine) and lipid peroxidation (HNE) formation [17].

Studies on lipid peroxidation in AD brain have been focused mostly on two polyunsaturated fatty acids: arachidonic acid, and docosahexaenoic acid,

because they are the most abundant fatty acids forming membrane phospholipids [14, 18, 19] and are the most vulnerable targets for free radical attack [20, 21]. Both fatty acids were found reduced in the hippocampus of patients with AD [22, 23].

The senescence-accelerated mouse strain SAMP8 was proposed as a suitable animal model for the study of aging-associated brain function decline [24]. It has been shown that SAMP8 mice have increased markers of brain lipid peroxidation and protein oxidation and, by 12 months of age, this strain develops elevated levels of A $\beta$  and severe deficits in learning and memory. Treatment with the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid decreases levels of both protein carbonyls and MDA, and reverses memory impairments [25, 26]. In other experiments in the same mouse brain, the administration of antisense oligonucleotides directed against the A $\beta$  region of the APP gene was shown to decrease soluble A $\beta$  peptide [27], reverse the memory deficits, and decrease brain oxidative markers [26].

Targets of protein oxidation during AD were identified using a proteomic approach. Oxidatively altered proteins included those dealing with energy metabolism, glutamate reuptake, phospholipid asymmetry, synaptic function, cell cycle control and proteasomal alterations. Among these proteins, the carboxy terminal of the ubiquitin hydrolase L-1 (UCH L-1) is specifically oxidized in AD, leading to loss of activity of the proteasome, and accumulation of damaged or aggregated proteins. Lipid peroxidation products including HNE are potent inhibitors of proteasome activity [28]. Since HNE is capable of cross-linking covalently to proteins, it is believed that it may inhibit proteasome activity in AD [29]. The inhibition of proteasome activity seems to be a necessary step leading to A $\beta$  neurotoxicity. On the other hand, the protein Pin-1 was found oxidatively modified in AD hippocampus and showed significantly diminished activity, which could be implicated in the accumulation of hyperphosphorylated tau [30].

In order to establish a time-course of oxidative stress-associated events in a model of AD pathology, Schuessel *et al.*, studied oxidative damage and enzymatic antioxidant defense in transgenic mouse models of AD at different ages [31]. Interestingly, in Thy1-APP751SL mice, reduced Cu/Zn-SOD activity leads to oxidative damage, which is probably related to amyloidogenic processing of APP. These results further support the increase of antioxidant defense for the prevention or therapy of AD [31].

Although genetic, biochemical, and neuropathological data strongly support the idea that A $\beta$  is a key element in AD pathogenesis [1], the etiopathology of this complex disease remains unclear. Considerable data suggest that AD is a polygenic and multifactorial illness and, as in other aged-related diseases, oxidative stress may be a key event [32, 33]. Interestingly,

there is an inexorable link between A $\beta$  and oxidative stress. In this sense, many *in vivo* and *in vitro* studies have shown that A $\beta$  aggregation induces oxidative stress and, on the other hand, free radicals increase the production of A $\beta$  [34-36]. This loop probably plays a crucial role in AD progression because oxidative stress is an age-dependent phenomenon [37] and aging is the greatest risk factor for AD.

Many research groups have supported the hypothesis that part of the toxic properties of A $\beta$  can be mediated via a pathway involving ROS. This view is strengthened by the observation that cells resistant to A $\beta$  toxicity have elevated levels of the antioxidant enzymes catalase and glutathione peroxidase [38] and because the use of vitamin E and other lipophilic antioxidants rescue neuronal cell lines from A $\beta$ -induced cytotoxicity [39].

In addition to the well-documented role of A $\beta$  in AD, extensive data from patient studies and *in vivo* animal models indicate that impaired brain metabolism is one of the cardinal and most frequent factors associated with this neurodegenerative dementia. In particular, reduced glucose oxidation and mitochondrial activity have been documented in AD patients [40-42]. Although the connection between metabolic impairment and the amyloid neurotoxic cascade has not been clearly elucidated, increased free radical generation has been associated with aging and appears to be involved in A $\beta$  neurotoxicity [43-45]. We developed an *in vivo* model of A $\beta$  neurotoxicity induced by the administration of A $\beta_{25-35}$  in the hippocampus of rats previously treated with iodoacetate, an inhibitor of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, or with the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid, an irreversible inhibitor of succinate dehydrogenase [46]. Our observations have consistently shown that in energy-deficient animals, A $\beta_{25-35}$  induces an extensive lesion in the dentate gyrus, while in energy-competent animals, A $\beta_{25-35}$  toxicity is erratic. Similarly, in isolated synaptic terminals from cortex and hippocampus, A $\beta$  toxicity is enhanced when incubated in the presence of the metabolic inhibitors [46]. These observations agree with previous *in vitro* results [47]. On the other hand, we have found increased free radical generation involved in the enhancement of A $\beta$  neurotoxicity during energy impairment and have demonstrated the potential neuroprotective actions of the antioxidant vitamin E [48].

## Oxidative stress and A $\beta$ production

The amyloid precursor protein (APP) is a type I integral membrane glycoprotein homologue to glycosylated membrane receptors present on the surface of neurons and glia [49-51]. The APP gene is located on the long arm

of chromosome 21 and is part of a multigene superfamily including 16 homologous amyloid precursor-like proteins (APLP) as well as APP homologues [52]. Phylogenetic analysis, protein sequence alignment of known homologues of the APP superfamily and experimental evidence support the cell adhesion function of the APP, although it has also been implicated in the modulation of differentiation, growth and connectivity of neurites [53-56]. The APP is a ubiquitous protein with high degree of evolutionary conservation [57]. Due to alternative splicing there are 10 isoforms ranging in size from 563 to 770 amino acids. Neurons mainly express a 695 amino acid-long form (APP695).

The metabolic processing of the APP has been well characterized in a number of cell lines [58]. Under normal metabolic conditions, about 90% of APP molecules are cleaved by the  $\alpha$ -secretase through the non-amyloidogenic pathway producing a neurotrophic soluble fragment ( $\alpha$ APP). On the other hand, the A $\beta$  is generated by the sequential processing of APP by two proteases,  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase, which produce the N and the C termini of A $\beta$ , respectively, through the amyloidogenic pathway.

The  $\alpha$ -secretase processing prevents the formation of A $\beta$ . Although the exact identity of  $\alpha$ -secretase has not been confirmed, pharmacological studies suggest that it could be a Zinc-dependent metalloprotease [59]. The activity of  $\alpha$ -secretase may be constitutive or inducible by activation of the protein kinase C [60]. It has been suggested that members of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family, such as the TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE or also called ADAM17), ADAM10 and ADAM9 are proteins with putative  $\alpha$ -secretase activity [61].

As mentioned above, when the APP is not metabolized, it can be internalized into endocytic compartments and subsequently cleaved by  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase. Among these enzymes,  $\beta$ -secretase is the key rate-limiting enzyme that initiates the formation of A $\beta$ . The  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme (BACE) has been identified as that containing the  $\beta$ -secretase activity. The BACE protein is homologous to the pepsin family of aspartyl proteases [62]. The BACE-1 is highly expressed in neurons and appears to be the major enzyme in the amyloidogenic pathway, while the homologous protein BACE-2 has distinct APP-cleavage specificity [63]. The other enzymatic activity in the amyloidogenic pathway is mediated by  $\gamma$ -secretase, a protein complex which cleaves within the transmembranal domain of the APP, and is formed by nicastrin, Aph-1, Pen-2 and presenilin (PS) which contain the protease activity of the complex [64, 65]. Each member of the complex is critical for its function because each one may modify the general activity or stability of  $\gamma$ -secretase as a response to specific physiological stimuli.

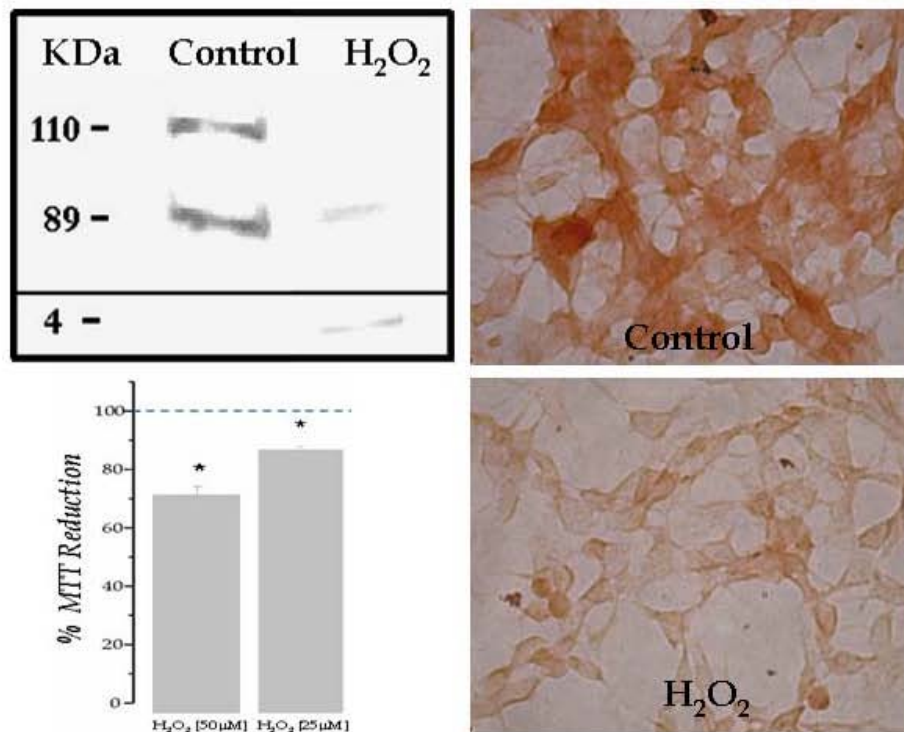


However, the mechanism by which APP metabolism is regulated by oxidative stress is, at present, not well understood yet. Some evidence suggests that oxidative stress may alter APP processing at different levels. Free radicals are able to modify proteins associated with the neuronal cytoskeleton and vesicle trafficking that indirectly may result in modification of APP processing through the amyloidogenic pathway. In this sense, it has been reported that neurons exposed to a damaging insult reorganize their actin cytoskeleton into rods (tapered cylindrical filamentous inclusions). These inclusions occlude neurites and disrupt the microtubules network causing distal neurite atrophy [66]. Human brains with AD exhibit rod-like inclusions, and a large percentage of the amyloid-rich senile plaques have been associated with rod-like aggregates. Rod-like structures can be formed by transient exposure to oxidative stress-induced conditions such as excitotoxicity and ischemia [67]. Moreover, hippocampal cells exposed to A $\beta$  show accumulation of vesicles containing APP, BACE and PS-1 at rods. Indeed, the BACE products: APP  $\beta$ -C-terminal fragment or A $\beta$  also accumulate into rods. Taken together this evidence strongly suggests that rods, formed in response to either A $\beta$  or other stress inductors, block APP transport and could enhance A $\beta$  production [68].

Clinical studies have suggested that the incidence of AD increases after ischemic or hypoxic episodes [69]. Furthermore, levels of A $\beta$  and APP are enhanced during experimental ischemia *in vivo* and in cellular models of chronic hypoxia. It is well known that induction of hypoxia leads to a rise of ROS [70]. Cortical astrocytes exposed to chronic hypoxia show a marked increase in A $\beta$  and PS-1 levels. Hypoxic-increase of A $\beta$  production was prevented by the use of the  $\beta$ - or  $\gamma$ - secretase inhibitors. Additionally, when the cells were incubated with antioxidants, PS-1 expression was not induced [71]. In this sense, HIF (hypoxia-inducible factor) binding regions have been recently shown in the PS-1 gene promoter regions [72], which potentially represent a site at which O<sub>2</sub> levels may regulate PS-1 activity. On the other study, SH-SY5Y cells exposed to a brief period of chronic hypoxia showed a significant reduction in the non-amyloidogenic processing of APP associated with decreased levels of the protein ADAM 10 and subsequently with  $\alpha$ APPs secretion [73].

In human neuroblastoma cells (MSN) we induced oxidative stress by incubating with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M during 4 h and we observed a significant reduction of the APP and  $\alpha$ -APP species and an increase in A $\beta$  suggesting that under free radical production the amyloidogenic processing of APP is enhanced (Fig. 1)

Oxidative stress in turn may contribute to A $\beta$  accumulation by generating modified A $\beta$  species with a high tendency to aggregate and resistant to clearance [36].



**Figure 1.** Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on APP and Aβ content of MSN cells. Representative Western-blot of APP (110 kDa) and α-APP (90 kDa) and Aβ (4 kDa) levels of MSN cells exposed during 4 h to 50 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Graph shows mitochondrial redox activity of MSN cells measured as MTT reduction after exposure to different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Immunocytochemistry shows the morphological aspect of MSN cells and the content of APP from control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM treated MSN cells. Used antibodies were: β-Amyloid (D17): sc-5399 y A4 (I-17): sc-7497.

## Oxidative stress, cholesterol and Aβ

AD is tightly linked to the accumulation of cholesterol. The role of cholesterol in AD pathogenesis has been supported by several epidemiological [74] and cellular findings [75]. A connection between cholesterol and Aβ accumulation was first demonstrated in rabbits [76] and, more recently, studies in transgenic mice have revealed cholesterol deposits with fibrillary Aβ in the amyloid plaques [77, 78].

Individuals with high levels of plasma cholesterol show increased susceptibility to AD [79] specially when the APOEε4 allele is present. Individuals that are homozygous for APOEε4 alleles (2% of the population) are eight times more likely to develop AD than homozygotes for APOEε3 and have higher levels of 24S-hydroxycholesterol in CSF [79, 80]. ApoE is the

main lipid transport protein in the brain and has the highest content of cholesterol in the body (approx. 20% of total body cholesterol) [81].

The brain is the organ with highest cholesterol content in the body, which mostly comes from *de novo* synthesis by a multienzyme cascade that begins with the action of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl CoA (HMG CoA) synthase and HMG CoA reductase. The latter enzyme is a target for the pharmacological compounds, statins. A number of studies have demonstrated a noteworthy reduction in the prevalence of AD in patients treated with statins [82, 83].

As has been mentioned, abnormal accumulation of A $\beta$  in specific brain regions and its clearance are processes regulated by cholesterol [84]. Cholesterol depletion after treatment with lovostatin, a lipophilic inhibitor of the HMG-CoA reductase, induced a significant decrease in the A $\beta$  load of neurons [85-88]. This cellular reduction was significant when cholesterol was depleted by about 30-40% [87]. On the other hand, simvastatin, a hydrophilic statin, efficiently diminished A $\beta$  production in cultured hippocampal neurons of guinea pigs [86, 88] and decreased levels of A $\beta$  in the CSF of AD patients. This reduction is small but significant for the A $\beta_{1-40}$  and correlates with a reduction of 24S-hydroxycholesterol, the cholesterol metabolite produced almost exclusively in human brain [89]. It was reported that reduced A $\beta$  levels is accompanied by increased  $\alpha$ -secretase activity [90] and that a high cholesterol diet in rabbits increased the neuronal content of cholesterol and raised BACE 1 levels [91]. Some studies have shown that cholesterol depletion favors a non-raft lipid (rich in cholesterol and sphingomyelin) environment in which  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase enzymes modify their cleaving actions on APP [92, 93]. Conversely, cholesterol loading enhanced amyloidogenic processing of membranous APP and, hence, an A $\beta$  cellular load increase nearly up to ten-fold higher than the normal cellular content [87].

Finally, during aging in mice, in AD patients and in neurons exposed to A $\beta$ , significant increases in membrane-associated oxidative stress have been reported as well as increased levels of long-chain ceramides and cholesterol, which presumably participate in the neurodegenerative cascade that ultimately results in AD [94]. Moreover, A $\beta$  was also reported to promote oxidative stress directly by catalytically producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from cholesterol [95] and together with APP, A $\beta$  has oxidative effects on cholesterol producing 7-hydroxycholesterol, a very toxic oxysterol [96].

## **Oxidative stress, A $\beta$ and abnormal cell cycle reentry**

Recent evidence indicates that, alongside oxidative stress, dysregulation of the cell cycle of neurons susceptible to degeneration during AD may play a crucial role in the initiation of the disease. In this sense, it has been suggested that neuronal cell death is linked to the aberrant activation of cell cycle

machinery in post-mitotic neurons. Expression of cell cycle-related proteins has been reported in a variety of neurodegenerative conditions in mouse and humans and in cultured neurons undergoing programmed cell death [97].

Overexpression of the powerful oncogene large T antigen in Purkinje cells and retinal neurons leads to incorporation of BrDU into nuclei, but in the end, it leads to cell death not to cell division [98, 99]. Rb functions as a tumor suppressor and typically arrests the cell cycle in the G1 phase. Thus the analysis of Rb *-/-* mice shows DNA synthesis together with apoptosis in CNS and PNS [100-102]. These early findings suggest that the abnormal attempt of mature neurons to activate the cell cycle may result in death. Numerous studies have provided evidence that cell cycle-associated mechanisms contribute to neurodegeneration in AD [103, 104].

### **Oxidative stress and cell cycle**

Elevated ROS levels lead to lipid, protein, and nucleic acid damage, and can result in cell death via apoptosis or necrosis. Oxidative stress and cell cycle abnormalities are implicated in several age-related neurodegenerative disorders. Studies about the effect of oxidative stress on the cell cycle reveal that, in proliferating cells, the detection of ROS-induced DNA damage causes cell cycle arrest and promotes DNA repair. If the damage is too extensive, apoptotic death is activated [105]. However, the description of the harlequin (Hq) mutant mouse provides data regarding to reactivation of the cell cycle in differentiated neurons stimulated by oxidative stress. These mice develop progressive ataxia and retinal degeneration associated with the death of cerebellar granule cells and retinal cells respectively. The Hq mutation is a proviral insertion in the first intron of the apoptosis-inducing factor gene (Aif), resulting in 80-90 % decline of the mRNA and protein. AIF is a flavoprotein of strong structural homology with glutathione reductase, an essential component of the scavenging glutathione system [106]. Downregulation of AIF in cerebellar extracts from Hq animals is correlated with oxidative markers: high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellular levels, and increased catalase activity and total glutathione. Another hallmark of oxidative stress is the presence of the modified base 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG) in many neuronal types, including cerebellar granule cells and retinal ganglion, amacrine and horizontal cells. The neurons of the Hq mouse also have defective cell cycle control. In older Hq mice, cerebellar granule and retinal cells expressed PCNA and CDC47, both S phase markers, and they also showed BrdU incorporation. Furthermore, all neurons that had re-entered to cell cycle were positive for 8-OhdG. However, not all 8-OhdG-positive cells were in S phase, suggesting a temporal relationship between oxidative stress and cell cycle reentry [107].

At present, the mechanism by which oxidative stress leads to cell cycle abnormalities is not well defined yet [107]. One possibility is that oxidative

stress may modify components of the mitogenic signalling pathway [108]. An additional possibility is that ROS-induced DNA damage may itself initiate cell cycle reentry [109].

## **A $\beta$ and cell cycle**

Numerous studies have implicated A $\beta_{1-42}$ -induced oxidative stress in the neurodegeneration observed in the AD brain [6]. Furthermore, incubation of PC12 cells with 1mM A $\beta_{1-42}$  for 4 h resulted in the formation of purine dimers in the DNA molecule. This led to the conclusion that free radicals generated by A $\beta$  cause oxidative DNA alterations, and deficient DNA repair may result in neuronal death [110].

Cell cycle markers such Cdk4, cyclins B, D and E, Ki 67 and p21 are expressed in neurons from AD brains [103, 104]. Considering that A $\beta$  seems to play an important role in AD, this raises the question of whether A $\beta$  is involved in the abnormal cell cycle reentry observed in this pathology.

Cultured neurons exposed to A $\beta_{1-42}$  or its active fragment A $\beta_{25-35}$  induces expression of G<sub>1</sub> markers: pRb, and the complex Cdk4/6 accompanied by neuronal death [111]. Another study reported that A $\beta$  leads also to induction of cyclins E, A and DNA synthesis. Blockade of the G<sub>1</sub>/S transition by a cyclin D antisense or dominant-negative mutant of Cdk2 prevented A $\beta$ -induced replication and apoptosis [112].

The question arises if the A $\beta$ -induced oxidative stress and the cell cycle activation are related. There is evidence suggesting that DNA oxidative damage induced by A $\beta$  can lead to cell cycle reentry. In brain tissue samples of 10-month-old APP mutant transgenic mice, increased levels of the human A $\beta_{1-40}$  and A $\beta_{1-42}$  were associated with increased levels of 8-OhdG, one of the most abundant DNA-oxidative stress product. Moreover, in cultured rat cortical neurons exposed to DNA damaging agents including topoisomerase II inhibitors, homocysteine and A $\beta$ , an increase in p53 and Cdc25 (G<sub>1</sub>/S) immunoreactivity was observed and accompanied by apoptosis. Flow cytometry analyses revealed a significant increase in the percentages of cultured neurons in S phase when incubated with these genotoxic agents [109].

At present, the question about the intracellular transducing mechanism involved in A $\beta$ -induced cell cycle reentry remains unresolved. The A $\beta$ -induced cell cycle activation in SH-SY5Y neuroblastoma cells seems to involve the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK 1/2). Inhibition of this pathway by the compound PD98059 completely prevented changes in cell cycle re-entry in the presence of A $\beta$  and significantly reduced neuronal death. Thus, the MAPK/ERK 1/2 pathway may participate directly in the induction or propagation of cell cycle events in AD [113].

To summarize, there is evidence that the oxidative DNA damage caused by A $\beta$  can lead to cell cycle activation in post-mitotic neurons [109]. This effect on cell cycle induction seems to be mediated through MAPK/ ERK 1/2 [113]. Therefore, these results suggest a potential association between A $\beta$  aggregates, production of ROS, DNA oxidative changes and neuronal cell loss observed in AD.

## Conclusions and perspectives

A variety of cellular mechanisms seems to be involved in the pathogenesis of AD. Recent investigations have started to focus on cellular pathways activated by oxidative stress that may mediate neuronal injury. There are complex metabolic interactions between free radicals, A $\beta$  toxicity and APP processing that may self-perpetuate pathogenesis in AD.

Increasing evidence shows that oxidative stress and aberrant mitogenic changes play important roles in the pathogenesis of this devastating neurodegenerative disease. However, although both oxidative stress and cell cycle-related abnormalities are early events occurring before any cytopathology, the relation between these two events and their role in the pathophysiology of the disease remain unclear.

Ultimately, targeting new avenues for the development of therapeutic strategies linked to mechanisms that involve cholesterol metabolism, cell-cycle regulation and age-related ROS generation, may provide fruitful gains for both the prevention and treatment of AD.

## Acknowledgments

The authors thank I. Pérez-Montfort for revising the English manuscript. Work supported by 48663-Q and 48645-Q CONACYT grants to CA and LM, respectively.

## References

1. Selkoe, D.J. 2001, *Physiol. Rev.*, 81, 741.
2. Nunomura, A., Castellani, R.J., Zhu, X., Moreira, P.I., Perry, G., and Smith, M.A. 2006, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 65, 631.
3. Halliwell, B. 2001, *Drugs Aging*, 18, 685.
4. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. 1996, *Am. J. Physiol.*, 271, C1424.
5. Behl, C., and Moosmann, B. 2002, *Free. Radic. Biol. Med.*, 33,182.
6. Butterfield, D.A. 2002, *Free. Radic. Res.*, 36, 1307.
7. Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., and Bush, A.I. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 3711.

8. Smith, M.A., Harris, P.L., Sayre, L.M., and Perry, G. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9866.
9. Lüth, H.J., Ogunlade, V., Kuhla, B., Kientsch-Engel, R., Stahl, P., Webster, J., Arendt, T., and Munch, G. 2005, *Cereb. Cortex*, 15, 211.
10. Selkoe, D.J. 2001, *Physiol. Rev.*, 81, 741.
11. Praticò, D., Clark, C.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Rokach, J., and FitzGerald, G.A. 2000, *Ann. Neurol.*, 48, 809.
12. Praticò, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. 2001, *J. Neurosci.*, 21, 4183.
13. Montine, T.J., Beal, M.F., Robertson, D., Cudkowicz, M.E., Biaggioni, I., O'Donnell, H., Zackert, W.E., Roberts, L.J., and Morrow, J.D. 1999, *Neurology*, 52, 562.
14. Montine, T.J., Montine, K.S., McMahan, W., Markesbery, W.R., Quinn, J.F., and Morrow, J.D. 2005, *Antioxid. Redox Signal.*, 7, 269.
15. Cecchi, C., Fiorillo, C., Sorbi, S., Latorraca, S., Nacmias, B., Bagnoli, S., Nassi, P., and Liguri, G. 2002, *Free. Radic. Biol. Med.*, 33, 1372.
16. McLellan, M.E., Kajdasz, S.T., Hyman, B.T., and Bacskai, B.J. 2003, *J. Neurosci.*, 23, 2212.
17. Abdul, H., Sultana, R., Keller, J.N., Clair, D.K., Markesbery, W.R., and Butterfield, D.A. 2006, *J. Neurochem.*, 96, 1322.
18. Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. 1998, *Neurobiol. Aging*, 19, 33.
19. Nourooz-Zadeh, J., Liu, E.H.C., Yhlen, B., Anggard, E.E., and Halliwell, B. 1999, *J. Neurochem.*, 72, 734.
20. Halliwell, B. 1992, *J. Neurochem.*, 59, 1609.
21. Porter, N.A., Caldwell, S.E., and Mills, K.A. 1995, *Lipids*, 30, 277.
22. Prasad, M.R., Lovell, M.A., Yatin, M., Dhillon, H., and Markesbery, W.R. 1998, *Neurochem. Res.*, 23, 81.
23. Soderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., and Dallner, G. 1991, *Lipids*, 26, 421.
24. Morley, J.E., Farr, S.A., and Flood, J.E. 2002, *Neurobiol. Learn. Membr.*, 78, 125.
25. Farr, S.A., Poon, H.F., Dogrukol-Ak, D., Drake, J., Banks, W.A., Eyerman, E., Butterfield, D.A., and Morley, J.E. 2003, *J. Neurochem.*, 84, 1173.
26. Poon, H.F., Joshi, G., Sultana, R., Farr, S.A., Banks, W.A., Morley, J.E., Calabrese, V., and Butterfield, D.A. 2004, *Brain Res.*, 1018, 86.
27. Kumar, V.B., Farr, S.A., Flood, J.F., Kamlesh, V., Franco, M., Banks, W.A., et al. 2000, *Peptides*, 21, 1769.
28. Friguet, B., and Szweda, L.I. 1997, *FEBS Lett.*, 405, 21.
29. Butterfield, D.A., Perluigi, M., and Sultana, R. 2006, *Eur. J. Pharm.*, 545, 39.
30. Sultana, R., Boyd-Kimball, D., Poon H.F., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B., Markesbery, W.R., Zhou, X.Z., Lu, K.P., and Butterfield, D.A. 2006, *Neurobiol. Aging*, 27, 918.
31. Schuessel, K., Schafer, S., Bayer, T.A., Czech, C., Pradier, L., Muller-Spahn, F., Muller, W.E., and Eckert, A. 2005, *Neurobiol. Dis.*, 18, 89.
32. Nunomura, A., Perry, G., and Aliev, G. 2001, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60, 759.
33. Perry, G., Nunomura, A., and Hirai, K. 2000, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 18, 417.
34. Harkany, T., Abraham, I., and Nyakas, C. 2000, *Rev. Neurosci.*, 11, 329.

35. Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., and Ihara, Y. 2000, *Biochemistry*, 39, 6951.
36. Paola, D., Domenicotti, C., and Nitti, P. 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 642.
37. Floyd, R.A., and Hensley, K. 2002, *Neurobiol. Aging*, 23, 795.
38. Sagara, Y., Dargusch, R., Klier, F.G., Schubert, D., and Behl, C. 1996, *J. Neurosci.*, 16, 497.
39. Behl, C., Davis, J.B., Cole, G.M., and Schubert, D. 1992, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 186, 944.
40. Meier-Ruge, W., and Bertoni-Freddari, C. 1996, *Rev. Neurosci.*, 7, 1.
41. Parker, W.D., Parks, J., Filley, C.M., and Kleinschmidt-DeMasters, B.K. 1994, *Neurology*, 44, 1090.
42. Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H., Ji, Y., Quartermain, D., Jensen, C.H., Duff, K., Nixon, R.A., Gruen, R.J., and Wisniewski, T. 2004, *Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63, 418.
43. Lorenzo, A., and Yankner, B.A. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12243.
44. Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., and Ames, B.N. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 10771.
45. Yatin, S.M., Varadarajan, S., Link, C.D., and Butterfield, D.A. 1999, *Neurobiol. Aging*, 20, 325.
46. Arias, C., Montiel, T., Quiroz-Baez, R., and Massieu, L. 2002, *Exp. Neurol.*, 176, 163.
47. Copani, A., Koh, J.Y., and Cotman, C.W. 1991, *NeuroReport*, 2, 763.
48. Montiel, T., Quiroz-Baez, R., Massieu, L., and Arias, C. 2006, *Exp. Neurol.*, 200, 496.
49. Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. 1987, *Nature*, 325, 733.
50. Yamazaki, T., Koo, E. H., and Selkoe, D. J. 1997, *J. Neurosci.*, 17, 1004.
51. Breen, K., Bruce, M., and Anderson, B., 1991, *J. Neurosci. Res.*, 28, 90.
52. Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, V., and Gadusek, D.C. 1987, *Science.*, 235, 877.
53. Alvarez, J., Moreno, R. D., Llanos, O., Inestrosa, N. C., Brandan, E., Colby, T. and Esch, F. S. 1992, *Neurosci. Lett.*, 144, 130.
54. Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., Younkin, S.G., and Hsiao, K.K. 1999, *Nat. Neurosci.*, 2, 271.
55. Van den Heuvel, C., Blumbergs, P.C., Finnie, J.W., Manavis, J., Jones, N.R., Reilly, P.L., and Pereira, R.A. 1999, *Exp. Neurol.*, 159, 441.
56. Gentleman, S.M., Nash, M.J., Sweeting, C.J., Graham, D.I., and Roberts, G.W. 1993, *Neurosci. Lett.*, 160, 139.
57. Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A.B., St. George-Hyslop, P.H., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., and Neve, R.L. 1987, *Science*, 235, 880.
58. Selkoe, D.J. 2003, *Neurochem. Res.*, 28, 1705.
59. Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J, and Hooper, N.M. 1998, *Biochemistry*, 37, 1680.



60. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3922.
61. Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. 2003, *Biochem. Biophys. Res.*, 301, 231.
62. Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Khan, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Joroszinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. 1999, *Science*, 286, 735.
63. Fluhner, R., Capell, A., Westmeyer, G., Willem, M., Hartung, B., Condron, M.M., Teplow, D.B., Haass, C., and Walter, J. 2002, *J. Neurochem.*, 81, 1011.
64. Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaeve, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., and St George-Hyslop, P. 2000, *Nature*, 407, 48.
65. Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J.S., and Curtis, D. 2002, *Dev. Cell.*, 3, 85.
66. Minamide, L.S., Striegl, A.M., Boyle, J.A., Meberg, P.J., and Bamberg, J.R. 2000, *Nat. Cell. Biol.*, 2, 628.
67. Bamberg, J.R. and Wiggan, O.P. 2002, *Trends Cell Biol.*, 12, 598.
68. Maloney, M.T., Minamide, L.S., Kinley A.W., Boyle, J.A., and Bamberg, J.R. 2005, *J. Neurosci.*, 25, 11313.
69. Tatemichi, T.K., Paik, M., Bagiella, E., Desmond, D.W., Stern, Y., Sano, M., Hauser, W.A., and Mayeux, R. 1994, *Neurology*, 44, 1885.
70. Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., and Schumacker, P.T. 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 25130.
71. Smith, I.F., Boyle, J.P., Green, K.N., Pearson, H.A., and Peers, C. 2004, *J. Neurochem.*, 88, 869.
72. Bazan NG., and Lukiw, W.J. 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 30359.
73. Webster, N.J., Green, K.N., Settle, V.J., Peers, C., and Vaughan, P.F.T. 2004, *Mol. Brain Res.*, 130, 161.
74. Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Bisgaier, C.L., Essenburg, A.D., Lampert, H.C., Drumm, D., and Roher, A.E. 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 711.
75. Galbete, J.L., Martin, T.R., Peressini, E., Modena, P., Bianchi, R., and Forloni, G. 2000, *Biochem. J.*, 348, 307.
76. Sparks, D.L., Scheff, S.W., Hunsaker III, J.C., Liu, H., Landers, T., and Gross D.R. 1994, *Exp. Neurol.*, 126, 88.
77. Burns, M.P., Noble, W.J., Olm, V., Gaynor, K., Casey, E., LaFrancois, J., Wang, L., and Duff, K. 2003, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 110, 119.
78. Refolo, L.M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., Duff, K., and Papolla, M.A. 2000, *Neurobiol. Dis.*, 7, 321.
79. Tanzi, R.E., and Bertram, L. 2001, *Neuron*, 32, 181.
80. Papassotiropoulos, A., Lutjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Buschfort, R., Ptok, U., Bjorkhem, I., von Bergmann, K., and Heun, R. 2002, *J. Psychiatr. Res.*, 36, 27.

81. Dietschy, J.M., and Turley, S.D. 2001, *Curr. Opin. Lipidol*, 12, 105.
82. Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., and Drachman, D.A. 2000, *Lancet*, 356, 627.
83. Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., and Siegel, G., 2000, *Arch. Neurol.*, 57, 1439.
84. Puglielli, L., Tanzi, R.E., and Kovacs, D.M. 2003, *Nature Neurosci.*, 6, 345.
85. Bodovitz, S., and Klein, W.L. 1996, *J. Biol. Chem.*, 8, 4436.
86. Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., Von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5856.
87. Frears, E.R., Stephens, D.J., Walters, C.E., Davies, H., and Austen, B.M. 1999, *Neuroreport*, 10, 1699.
88. Simon, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., and Simons, K. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6460.
89. Simons, M., Schwärzler, F., Lütjohann, D., Von Bergmann, K., Beyreuther, K., Dichgans, J., Wormstall, H., Hartmann, T., and Schulz, J.B. 2002, *Ann. Neurol.*, 52, 346.
90. Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., März, W., and Fahrenholz, F. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5815.
91. Othman, G., Larse, B., Schrag, M., and Herman, M.M. 2006, *Exp. Neurol.*, 200, 460.
92. Wolozin, B. 2004, *Neuron*, 41, 7.
93. Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., and Golde, T.E. 2002, *Neurobiol. Dis.*, 9, 11.
94. Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., and Mattson, M.P. 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2070.
95. Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L., Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., Bush, A.I. 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 40302.
96. Nelson, T.J., and Alkon, D.L. 2005, *J. Biol.*, 280, 7377.
97. Becker, E.B.E., and Bonni, A. 2004, *Prog. Neurobiol.*, 72, 1.
98. Feddersen, R.M., Ehlenfeldt, R., Yunis, W.S., Clark, H.B., and Orr, H.T. 1992, *Neuron*, 9, 955.
99. Al-Ubaldi, M.R., Hollifield, J.G., Overbeek, P.A., and Baehr, W. 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1194.
100. Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., and Bradley, A. 1992, *Nature*, 359, 288.
101. Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., and Te Riele, H. 1992, *Nature*, 356, 328.
102. Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A. 1992, *Nature*, 359, 295.
103. Nagy, Z., Esiri, M.M., Cato, A.M., and Smith, A.D. 1997, *Acta Neuropathol.*, 94, 6.
104. Busser, J., Geldmacher, D.S., and Herrup, K. 1998, *J. Neurosci.*, 18, 2801.
105. Migliore, L., and Coppede, F. 2002, *Mutant Res.*, 512, 135.
106. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzmi, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Constantini, P., Loeffler, M., Larochette, M., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. 1999, *Nature*, 397, 441.

- 
107. Klein, J.A., and Ackerman, S.L. 2003, *J. Clin. Invest.*, 111, 785.
  108. Martindale, J.L., and Holbrook, N.J. 2002, *J. Cell. Physiol.*, 192, 1.
  109. Kruman, I.I, Wersto, R.P, Cardozo-Pelaez, F., Smilenov, L., Chan, S.L, Chrest, J., Emokpae, R.Jr., Gorospe, M., and Mattson, M.P. 2004, *Neuron*, 41, 561.
  110. Duker, N.J., Sperling, J., Soprano, K.J., Druin, D.P., Davis, A., and Ashworth, R. 2001, *J. Cel. Biochem.*, 81, 393.
  111. Giovanni, A., Wirtz-Brugger, F., Keramaris, E., Slack, R., and Park, D.S. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 19011.
  112. Copani, A., Condorelli, F., Caruso, A., Vancheri, C., Sala, A., Giuffrida-Stella, A.M., Canonico, P.L., Nicoletti, F., and Sortino, M.A. 1999, *FASEB. J.*, 13, 2225.
  113. Frasca, G., Chiechio, S., Vanchery, C. Nicoletti, F., Copani, A., and Sortino, M.A. 2004, *J. Mol. Neurosci.*, 22, 231.

- Quiroz-Baez R, Rojas E, Arias C. (2009) Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase expression. *Neurochemistry International* 55: 662–670.



## Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of $\alpha$ -, $\beta$ - and $\gamma$ -secretase expression

Ricardo Quiroz-Baez, Emilio Rojas, Clorinda Arias\*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510 México, DF, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 December 2008  
Received in revised form 26 May 2009  
Accepted 16 June 2009  
Available online 26 June 2009

#### Keywords:

Human APP  
 $\beta$ -Amyloid protein  
Oxidative stress  
JNK  
 $\alpha$ -,  $\beta$  and  $\gamma$  secretases  
Thr668 APP

### ABSTRACT

The pathogenesis of Alzheimer disease (AD) is complex and is certain to involve diverse etiological factors, but a central role has been strongly suggested for amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ), based on genetic, biochemical and neurotoxicological evidence. In contrast with the well-documented effect of genetic mutations in  $A\beta$  overproduction, not much is known about the mechanisms involved in sporadic AD (SAD) which account for more than 95% of cases. Extensive data from patients and *in vivo* animal models indicate that oxidative stress is one of the cardinal factors most frequently associated with this neurodegenerative disease. The aim of the present study was to explore the effect of oxidative stress on the normally expressed wild-type amyloid precursor protein (APP) in human neuroblastoma cells, which represents a more physiological model of neuronal  $A\beta$  generation. Since  $H_2O_2$  is the main source of the highly reactive hydroxyl radical in the brain, and  $FeCl_2$  can stimulate oxidative stress, including the formation of the hydroxyl radical from  $H_2O_2$ , in the present work we studied the effect of these two pro-oxidant molecules on the levels and processing of human APP by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase, and the role of the stress-activated kinase c-jun N-terminal kinase (JNK). We provide evidence for a dual modulation of amyloid precursor protein metabolism in differentiated human neuroblastoma cells related with a down-regulation of  $\alpha$ -secretase and up-regulation of  $\gamma$ -secretase, and particularly of  $\beta$ -secretase and also a JNK depending  $A\beta$  generation.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Although Alzheimer's disease (AD) has a complex pathogenesis and its etiology is not well understood yet, substantial evidence has established that altered metabolism of amyloid precursor protein (APP) is a key event in the generation of amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ) which is deposited in the AD brain (Selkoe, 2001; Hardy, 2006) and may be responsible for the synaptic dysfunction and neuronal death.

The metabolic processing of APP is complex and can occur via several pathways named amyloidogenic or non-amyloidogenic (Selkoe, 2003) depending on the cleavage of the molecule, which is directed by  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -secretase (Esler and Wolfe, 2001).

Under normal metabolic conditions,  $\alpha$ -secretase processes about 90% of APP by the non-amyloidogenic pathway. This form of proteolytic cleavage generates a soluble neurotrophic fragment (sAPP $\alpha$ ) and prevents the formation of  $A\beta$ . Members of the ADAM

(a disintegrin and metalloprotease) protein family, such as ADAM10 and ADAM17 (also called TACE), are known to show  $\alpha$ -secretase activity (Parvathy et al., 1998; Asai et al., 2003). In the amyloidogenic pathway,  $A\beta$  is released from the membrane-spanning APP by sequential proteolytic processing under the action of  $\beta$ -secretase (the key rate-limiting enzyme) and  $\gamma$ -secretase. The  $\beta$ -secretase activity is conferred by a transmembrane aspartyl protease,  $\beta$ -amyloid cleaving enzyme 1 (BACE1) (Vassar et al., 1999), while  $\gamma$ -secretase is a protein complex formed by nicastrin, Aph-1, Pen-2 and presenilin (PS), which contains the protease activity of the complex (Wolfe et al., 1999; Yu et al., 2000; Francis et al., 2002). The yield of two main  $A\beta$  species ( $A\beta_{40}$  and  $A\beta_{42}$ ) is determined by the action of  $\gamma$ -secretase (Marlow et al., 2003).

In familial cases of AD (FAD), inherited mutations in the APP gene alter the amount and aggregation properties of  $A\beta$  (Goate et al., 1991). On the other hand, mutations within the presenilin 1 and 2 genes increases the  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  ratio along life and cause very early and severe forms of AD (Lemere et al., 1996; Levy-Lahad et al., 1995; Rogaeve et al., 1995; Scheuner et al., 1996; Sherrington et al., 1995). However, much less is known about the mechanisms

\* Corresponding author. Tel: +52 55 56229215; fax: +52 55 56229182.  
E-mail address: [carias@servidor.unam.mx](mailto:carias@servidor.unam.mx) (C. Arias).

involved in the overproduction of A $\beta$  in sporadic AD (SAD), which accounts for more than 95% of cases. In experimental models, altered APP metabolism has been found during different brain insults such as ischemia (Saido et al., 1994); excitotoxicity (Stephenson and Clemens, 1998), synaptic damage (Hernández-Ortega et al., 2007); energy metabolism inhibition (Velliquette et al., 2005) and oxidative stress (Tong et al., 2005; Tamagno et al., 2005, 2008a; Shen et al., 2008). In addition, the expression and the activity of PS1 and BACE1 are elevated in the brain of late-onset SAD human patients (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Yang et al., 2003; Matsui et al., 2007).

Recently, extensive literature reports oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and calcium dyshomeostasis as the early contributors in AD pathology, occurring prior to the development of detectable plaques and tangles (Nunomura et al., 1999, 2000, 2001; Praticò et al., 2001; Lee et al., 2005). One of the major insults to brain during aging is oxidative stress, which is often associated with the lack of protection against the cellular generation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense systems in the cell.

The molecular mechanism underlying the promotion of amyloidogenic processing of APP that leads to the production of A $\beta$  by oxidative stress is not completely understood, but significant progress has been achieved recently. It has been observed in neuroblastoma cells that, under pro-oxidant conditions, BACE1 is over-expressed by a mechanism involving the *c-jun* N-terminal kinase (JNK) activation (Tamagno et al., 2005, 2008b). A JNK-dependent activation of  $\gamma$ -secretase has also been reported in neuroblastoma cell lines stably expressing APP695myc under similar stress situation (Shen et al., 2008). On the other hand, in differentiated PC12 cells, oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) significantly increased BACE1-promoter activity and A $\beta$  generation from APP carrying the human Swedish mutation (Tong et al., 2005).

At present, the effect of oxidative stress on normally expressed wild-type APP has not been studied, and it may represent a more physiological model of neuronal A $\beta$  generation. Since H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the main source of the highly reactive hydroxyl radical in the brain, and FeCl<sub>2</sub> can stimulate oxidative stress including the formation of the hydroxyl radical from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in the present work we studied the effect of these two pro-oxidant molecules on the levels and metabolism of human APP.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture

The human neuroblastoma cell-line MSN (Reynolds et al., 1986) was grown in 24-well plates with RPMI 1640 medium containing non-essential amino acids plus 10% fetal calf serum in an atmosphere of 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub> at 37 °C, and were plated at a density of 1 × 10<sup>6</sup> cells per well. After 24 h in culture, neurons were differentiated adding 10  $\mu$ M retinoic acid plus 50 ng/ml NGF during 5 days. At the end of this period the incubation medium was replaced by fresh medium and neurons were exposed to sub-lethal concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25  $\mu$ M) and FeCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) for 24 h. In other experiments, MSN cells were exposed to the JNK inhibitor SP600125 (5  $\mu$ M, Calbiochem) 1 h before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and FeCl<sub>2</sub> treatments.

### 2.2. Cell viability assay

Cell viability was assessed by the trypan blue exclusion method. After 24 h of treatment, cells were harvested in physiological saline, 10  $\mu$ l of 0.4% trypan blue dye solution (Gibco) were added to 10  $\mu$ l of cells from each condition sample. Cells that excluded trypan blue were considered viable and were counted with the aid of a hemocytometer. Results are expressed as percentage of control values. Values are the mean  $\pm$  SEM of 6–8 independent experiments made in quadruplicate.

### 2.3. Measurement of ROS formation

ROS were determined with a modified fluorometric assay (Lee et al., 2003), which employs dihydrorhodamine 123 (DHR) (Sigma, St. Louis, MO, USA) as the probe. When DHR is oxidized by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of peroxidases it produces the

fluorescent compound rhodamine 123 (Gomes et al., 2005). MSN cells were treated as described above and then harvested. A 100  $\mu$ l aliquot of the samples (around 1 × 10<sup>6</sup> cells) was centrifuged at 1200 rpm for 5 min. Then, 180  $\mu$ l of buffer containing in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgSO<sub>4</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 15 HEPES, and 20  $\mu$ l of 1  $\mu$ M DHR was added to the pellet and incubated at 37 °C for 2 min. The fluorescent product rhodamine 123 was measured using a spectrophotometer at 505 nm. Results are expressed as percentage of control values. Values are the mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments made in duplicate.

### 2.4. Western blot

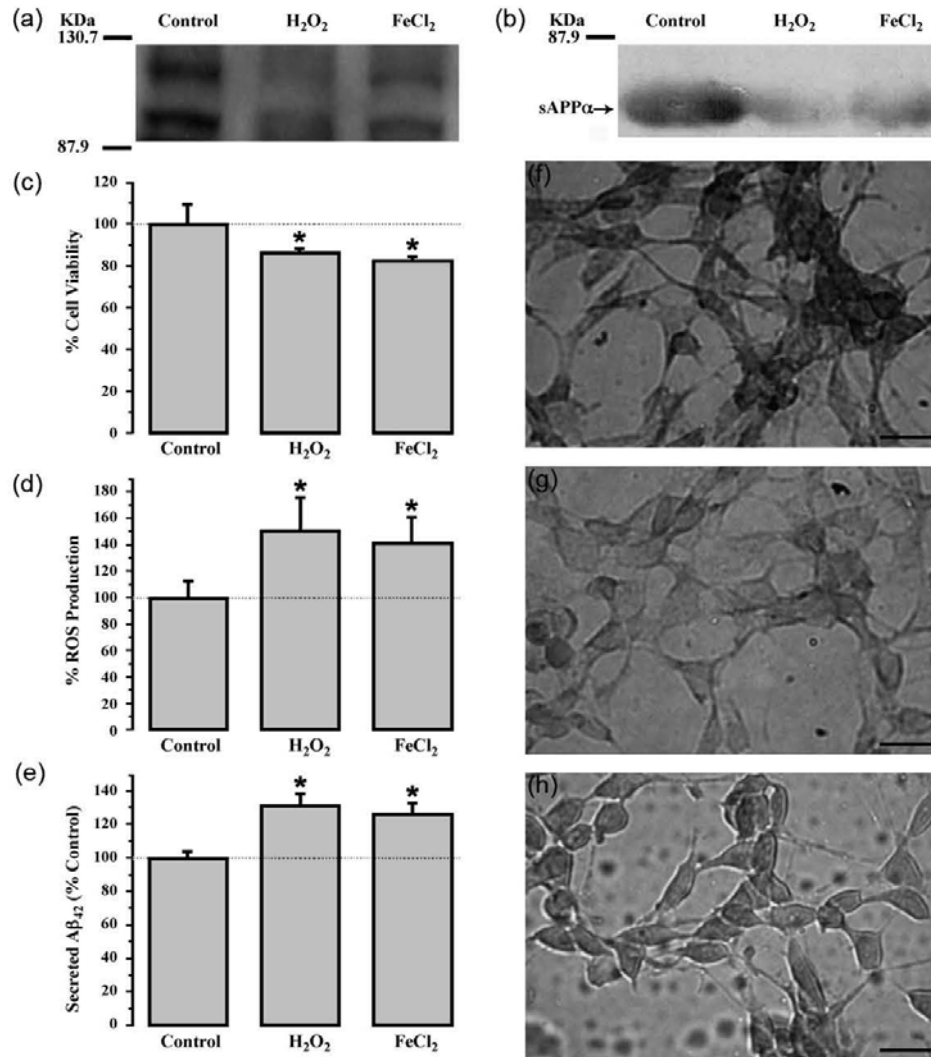
After being treated, MSN cells were harvested in lysis buffer containing: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% desoxicolate and Complete™ protease inhibitors cocktail (Roche), and then sonicated. Homogenates were centrifuged at 14,000 rpm for 75 min and the supernatant collected to analyze APP levels. Conditioned media was collected to detect secreted sAPP $\alpha$ . Twenty-five micrograms of protein were loaded on a 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Staining with reversible Ponceau was used to confirm loading of comparable amounts of protein. Then, membranes were washed twice with PBS and blocked with solution containing PBS/5% non-fat dry milk, and incubated overnight at 4 °C. In the same blocking solution, the membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody anti-Alzheimer Precursor Protein A4 (22C11) (1:500, Chemicon International), for sAPP $\alpha$ , goat polyclonal anti-Alzheimer A4 (1-17): sc-7497 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-ADAM10 (1:500, Chemicon International), rabbit polyclonal anti-TACE/ADAM17 (1:500, Chemicon International), mouse monoclonal anti-BACE (1:500, Chemicon International), mouse monoclonal anti-Presenilin 1 (1:500, Chemicon International), goat polyclonal anti-Nicastrin (N-19): sc-14369 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-Phospho-APP(Thr668) (1:500, Cell Signaling) and mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After three washes of 5 min each with PBS/0.1% Tween 20, membranes were incubated during 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody: goat anti-mouse IgG (1:10,000, Zymed), goat anti-rabbit IgG (1:15,000, Santa Cruz, Biotechnology, Inc.) and chicken anti-goat IgG (1:15,000, Chemicon International). Membranes were subsequently washed (three washes/5 min each) with PBS/0.1% Tween 20 and antibody signal was detected by chemiluminescence (ECL kit from Amersham, Arlington Heights, IL) on Kodak X-Omat films. Negative controls were prepared by omitting primary antibodies from the procedure. Densitometric analysis of the Western blot bands was carried out with NIH 1.38x ImageJ software. Results are expressed as arbitrary optic density units (ODU). Values are the mean  $\pm$  SEM of 6–8 independent experiments.

### 2.5. Immunohistochemistry

MSN cells were grown on coverslips, washed twice in cold PBS for 5 min and fixed with methanol at –20 °C for 5 min and washed again with PBS. Cells were permeabilized with PBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution for 10 min at room temperature and left with blocking solution (PBS/2% normal horse serum) overnight at 4 °C. Then, cells were incubated with mouse monoclonal anti-Alzheimer Precursor Protein APP643-95 (1:500, Chemicon International), goat polyclonal anti-Alzheimer A4 (1-17): 1:250, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-ADAM10 (1:500, Chemicon International) and mouse monoclonal anti-BACE (1:500, Chemicon International) for 24 h at 4 °C and washed three times for 5 min with PBS. Immediately after, cells were incubated with biotinylated secondary antibody: anti-goat IgG (1:4000 Vector Laboratories, Burlingame, CA), anti-rabbit IgG (1:4000 Vector Laboratories, Burlingame, CA) or anti-mouse IgG (1:10,000 Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 2 h at room temperature, and washed again with PBS. Later, cells were processed with the ABC-biotinavidin peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and revealed with diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. For fluorescence immunocytochemistry, control and treated cells were labelled with an antibody against p-JNK (Phosphorylated Thr-183 and Tyr-185, 1:250) (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Immunoreactivity was visualized using a TRITC-goat anti-mouse conjugated secondary antibody (1:250, Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Nucleus were stained incubating cells with DAPI (1 mg/ml) during 5 min. Cells were analyzed using a laser scanning confocal microscope (Zeiss, LSM 5 Pascal, Axioplan 2) and with a fluorescence microscope (Zeiss Axioscop 40). Negative controls were prepared by omitting primary antibodies from the procedure.

### 2.6. A $\beta$ <sub>42</sub> ELISA

A $\beta$ <sub>42</sub> levels in MSN cells were determined using an A $\beta$ <sub>42</sub>-specific sandwich ELISA according to the recommendations of the manufacturer (BioSource International, USA). After being treated as previously described, the MSN cell culture medium was collected and samples were analyzed by ELISA assay. A $\beta$ <sub>42</sub> concentration was detected reading optical densities at 450 nm on a BioRad Microplate Reader, Model 550. Results are expressed as percentages of control values. Values are the mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments made in duplicate. Results are expressed as percentage of optical density compared with control cells.



**Fig. 1.** Oxidative stress-inducing conditions reduced APP and sAPP $\alpha$  levels in the human MSN cells with a concomitant increase in A $\beta$ <sub>42</sub>. (a) Representative Western blot of APP from MSN cells incubated during 24 h in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25  $\mu$ M) and FeCl<sub>2</sub> (10  $\mu$ M). (b) Representative Western blot of secreted APP $\alpha$  fragment. (c) Cell viability evaluated by the trypan blue exclusion assay. (d) Determination of ROS production after treatments. (e) ELISA determination of secreted levels of A $\beta$ <sub>42</sub>. Micrographs show APP immunoreactivity in MSN cells under control conditions (f) and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (g) or FeCl<sub>2</sub> (h). Scale bar 50  $\mu$ m. All data are expressed as the percentage of control values and represent the mean  $\pm$  SEM of 6–8 independent determinations performed in quadruplicate and 3 experiments for sAPP $\alpha$  levels. Control \* $p$  < 0.05.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical significance was determined using Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé's test. All results are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

## 3. Results

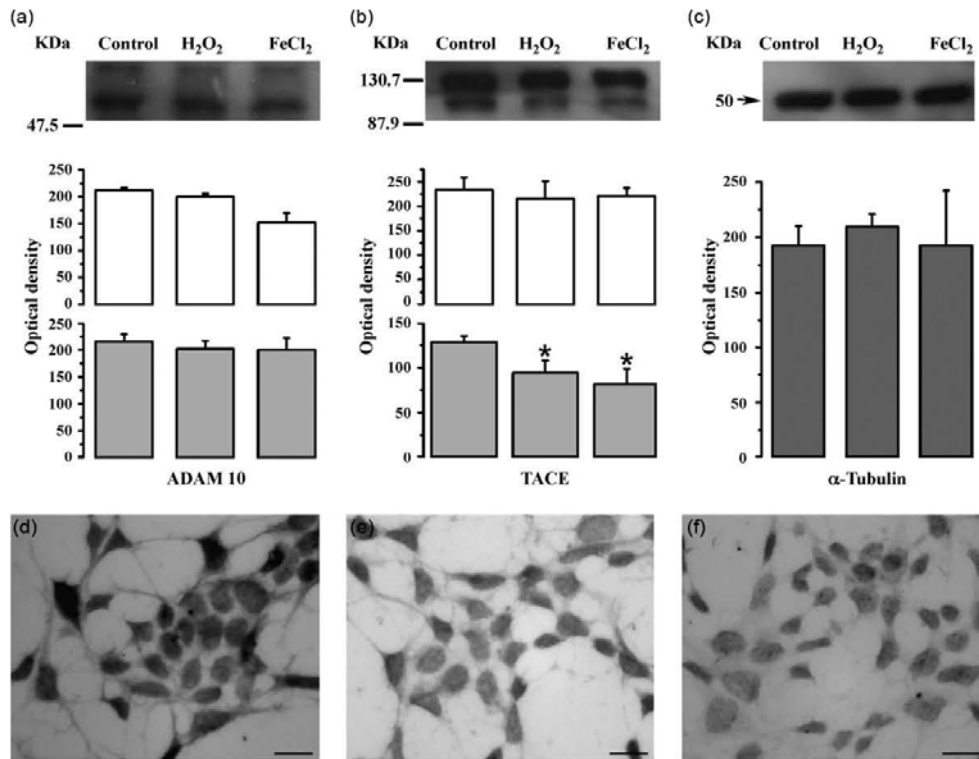
### 3.1. Oxidative stress reduces the content of APP and sAPP $\alpha$

We initially examined the effect on APP and A $\beta$  levels of exposing MSN cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and FeCl<sub>2</sub> at doses high enough to induce a significant increase in ROS production without causing significant neurodegeneration. Fig. 1 shows a significant decrease in full-length APP (Fig. 1a) and in non-amyloidogenically secreted  $\alpha$ APP (sAPP $\alpha$ ) levels (Fig. 1b) in the presence of both pro-oxidant

agents, as revealed by Western blot and by immunocytochemistry (Fig. 1f–h), concomitant with a small reduction of about 15% in cell viability (Fig. 1c) and a 50% increase in ROS production (Fig. 1d). Under these conditions, secreted levels of A $\beta$ <sub>42</sub> were increased by 30% (Fig. 1e), indicating that oxidative stress favors the amyloidogenic processing of APP.

### 3.2. Decreased expression of enzymes with $\alpha$ -secretase activity after oxidative stress

To determine whether the observed reduction in sAPP $\alpha$  levels and A $\beta$ <sub>42</sub> production was associated with ROS-induced differential changes in the expression of secretases involved in non-amyloidogenic APP metabolism, we examined the levels of putative enzymes with  $\alpha$ -secretase activity, particularly of ADAM-10 and TACE. These



**Fig. 2.** Levels of enzymes with  $\alpha$ -secretase activity decrease under oxidative stress conditions. Representative Western blots and densitometric analysis of the expression of immature (upper bands) and mature (lower bands) forms of ADAM10 (a) and TACE (b) and  $\alpha$ -tubulin (c) as quantity control protein, after 24 h of oxidative stress-inducing treatments. Micrographs show ADAM10 immunoreactivity in MSN cells under control conditions (d), and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (e) or FeCl<sub>2</sub> (f). Scale bar 50  $\mu$ m. Densitometric analysis values are expressed as the arbitrary optical density units (ODU) mean  $\pm$  SEM of 6 independent determinations performed in duplicate. Control \* $p < 0.05$ .

enzymes endoproteolyze APP within the A $\beta$  site to produce the secreted  $\alpha$ APP fragment. Two immunoreactive bands of ADAM-10 were visible in the cellular fractions (Fig. 2a), the upper one corresponding to the non-enzymatically active proenzyme (85 kDa), and the lower one corresponding to the metabolically active form of ADAM 10 (68 kDa). A slight but non-statistically significant reduction of the metabolically active form was observed in the presence of FeCl<sub>2</sub> (Fig. 2a). The decreased level of ADAM-10 was more evident by immunocytochemistry when comparing control cells (Fig. 2d) with cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 2e) and FeCl<sub>2</sub> (Fig. 2f). Under equal conditions, TACE enzymes seem to be more vulnerable to oxidative stress, and a significant reduction of protein level (~50% decrease) was clearly observed in the band that corresponds to the mature and active form (Fig. 2b, bottom band). These results demonstrated a decrease in the protein content of enzymes with  $\alpha$ -secretase activity associated with the oxidative stress.

### 3.3. Oxidative stress up-regulates presenilin 1 and BACE1 expression

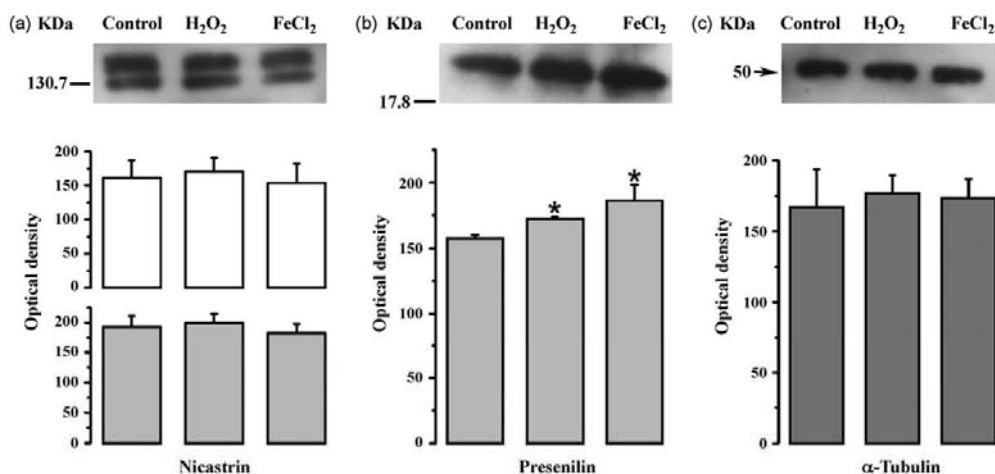
Once the participation of oxidative stress in the diminished levels of enzyme that determine the metabolic route involved in non-amyloidogenic APP-processing had been shown, we proceeded to examine the effect of this metabolic stress on the expression of two components of the  $\gamma$ -secretase proteolytic complex: nicastrin and presenilin 1. Fig. 3 shows that, while mature and immature nicastrin levels did not change in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or FeCl<sub>2</sub> (Fig. 3a), a significant increase in presenilin was reached under the same stress conditions (Fig. 3b).

Because BACE1 is the key rate-limiting enzyme for A $\beta$  production, we next determined whether oxidative stress also increases the level of this enzyme. The exposure of differentiated MSN cells to both pro-oxidant conditions elevates the expression of BACE1 by about 40% (Fig. 4a). The same effect was observed by immunocytochemistry when comparing the BACE1 content in control MSN cells (Fig. 4c) with that in MSN cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 4d) or FeCl<sub>2</sub> (Fig. 4e).

### 3.4. Increased pThr668 by JNK is associated with APP misprocessing

We then examined the mechanism that links oxidative stress with a differential change in APP-processing enzyme levels. Although controversy exists regarding the role of Thr668 phosphorylation (pThr668) in amyloidogenic APP-processing, we found an increase of this phosphoepitope under pro-oxidant conditions. First we studied the appearance of phosphorylated full-length APP and proteolytic fragments. Fig. 5 shows that, 24 h after MSN cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or FeCl<sub>2</sub>, both phospho-APP and the phospho-C99 fragment increased markedly (Fig. 5a), as the content of APP and sAPP $\alpha$  levels fell (Fig. 5c), suggesting that BACE1 was activated, and acted on the  $\beta$ -site of APP producing the pThr668-C99 (Fig. 5a). As the appearance of the pThr668 epitope under stress conditions mainly depends on JNK activation (Kimberly et al., 2005), we tested the effect of the JNK inhibitor SP600125, on the pThr668 epitope and APP-processing. As shown in Fig. 5b and d, both the pThr668 epitope, as well as APP and sAPP $\alpha$  levels did not change after the induction of oxidative stress





**Fig. 3.** Protein content of members of the  $\gamma$ -secretase complex. Representative Western blots and densitometric analysis of MSN cells, which show the expression of nicastrin (a), presenilin 1 (b) and  $\alpha$ -tubulin (c), after 24 h of oxidative stress-inducing treatments. The upper band indicates the immature form of nicastrin, and the bottom shows the mature form. Densitometric analysis values are expressed as the arbitrary optical density units (ODU) mean  $\pm$  SEM of 6 independent determinations performed in duplicate. Control \* $p < 0.05$ .

in the presence of JNK inhibition. Furthermore, neuronal exposure to pro-oxidant conditions caused an increase in the amount of phosphorylated-JNK (Fig. 6a–c) and produced nuclear accumulation of the protein (Fig. 6d–f).

#### 4. Discussion

The present study demonstrates that during exposure of human neuroblastoma cells to pro-oxidant conditions, the main proteolytic enzymes that process APP were differentially modulated. Wild-type expressed human APP was effectively proteolyzed into A $\beta$ 42 by a route involving decreased expression of enzymes with  $\alpha$ -secretase activity and increased expression of BACE1 and presenilin.

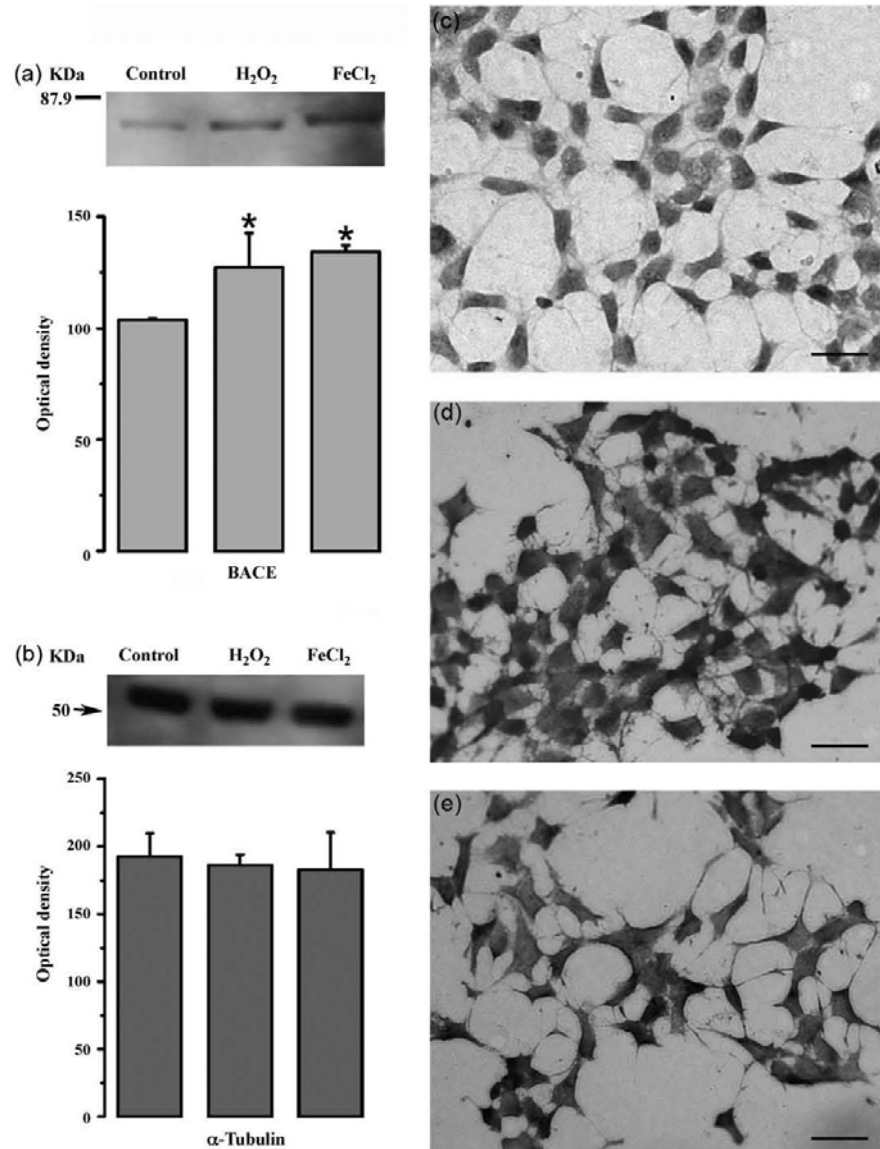
In patients with AD, the state of oxidative products is related to the cerebral damage, and ample experimental evidence supports the importance of oxidative stress in the pathogenesis of this disease. Some of these studies have shown increased levels of nucleic acid, protein and lipid oxidation in the brain of AD patients (Behl and Moosmann, 2002; Butterfield, 2002) and high concentrations of Fe (III) and Cu (II) in amyloid plaques which, in the presence of A $\beta$  promote its aggregation, enhancing metal-catalyzed oxidative stress associated with amyloid plaque formation (Huang et al., 1999; Smith et al., 1997). Other studies have detected increased levels of products of lipid peroxidation, such as isoprostanes in plasma and in the brain of AD patients, as well as in transgenic mice which overexpress mutated human APP (Praticò et al., 2000, 2001; Montine et al., 2005). In addition, Cecchi et al. (2002) showed raised levels of malondialdehyde (MDA), and 4-hydroxy-2-nonenal in fibroblasts and lymphoblasts of familial AD patients.

At present it is well known that pro-oxidant conditions regulate APP mainly modulating the expression and activity of BACE1 (Tong et al., 2005; Tamagno et al., 2005, 2008a; Shen et al., 2008), and the activity of  $\gamma$ -secretase (Tamango et al., 2008). We expanded these findings and reported herein that concomitant with an increase of pro-amyloidogenic processing of wild-type human APP, a reduced non-amyloidogenic route seems to participate through diminished expression of enzymes with  $\alpha$ -secretase activity such as ADAM10 and TACE/ADAM17. The  $\alpha$ -secretase processing prevents the

formation of A $\beta$  and, contrariwise, the reduction of its activity may be involved in increased production of this peptide.

Although the exact identity of  $\alpha$ -secretase has not been confirmed, pharmacological studies suggest that it could be a zinc-dependent metalloprotease (Parvathy et al., 1998). It has been suggested that members of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) family, such as the TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE or also called ADAM17), ADAM10 and ADAM9 are proteins with putative  $\alpha$ -secretase activity (Parvathy et al., 1998; Asai et al., 2003) and particularly ADAM10 seems to be responsible for basal and regulated APP metabolism, while TACE/ADAM17 appears to be responsible only for regulated APP cleavage (Buxbaum et al., 1998). In the present study we found that, in the presence of oxidative stress, a more important reduction in the mature active form of TACE/ADAM17 protein levels occurs and was associated with diminished levels of sAPP $\alpha$ . Although the mechanism by which oxidative stress reduced the levels of  $\alpha$ -related secretase it is unknown, it has been observed that the maturation of the ADAM family depends on a cysteine-rich region (Loechel et al., 1999) which could be easily oxidized, been a target for oxidative stress. In this context it has been recently reported in neuroblastoma cells that a slight increase in TACE/ADAM17 had a strong effect, lowering levels of A $\beta$  (Tachida et al., 2008). It has also been reported that  $\alpha$ -secretase activity in neuronal cells exposed to the antioxidant compound myricetin was increased (Shimmyo et al., 2008). On the other hand, it has been showed an altered processing of APP in SH-SY5Y cells exposed to chronic hypoxia, showing a decrease in sAPP $\alpha$  levels coinciding with a down-regulation of ADAM10 and TACE proteins without altering their mRNA levels (Webster et al., 2004; Marshall et al., 2006). Taking together previous evidence and present results we can point out that even a subtle change in TACE/ADAM17 function, as those observed in present work, could be enough to diminish the non-amyloidogenic route of APP metabolism, resulting, as shown herein, in reduced levels of the neurotrophic peptide sAPP $\alpha$ .

Both oxidant conditions used in the present study also induced up-regulation of  $\gamma$ -secretase, indicated by a significant increase in presenilin protein, which holds the catalytic activity of the  $\gamma$ -secretase complex, but no increase in nicastrin levels, which has a stabilized role of the complex. Previously, evidence was provided



**Fig. 4.** Protein levels of  $\beta$ -secretase increase under oxidative stress conditions. Representative Western blots and densitometric analysis of BACE1 (a) and  $\alpha$ -tubulin (b), after 24 h of oxidative stress-inducing treatments. Micrographs show BACE1 immunoreactivity in MSN cells under control conditions (c) and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d) or FeCl<sub>2</sub> (e). Scale bar 50  $\mu$ m. Densitometric analysis values are expressed as the arbitrary optical density units (ODU) mean  $\pm$  SEM of 6 independent determinations performed in duplicate. Control \* $p < 0.05$ .

that oxidative stress up-regulates the activity of  $\gamma$ -secretase (Tamagno et al., 2008a; Shen et al., 2008) but our data demonstrate that presenilin could be specifically involved in this effect under oxidative conditions. On the other hand, BACE1 is the major  $\beta$ -secretase enzyme to cleave APP. The BACE1 cleaved product of APP, the C99 fragment, is further processed by  $\gamma$ -secretase to generate A $\beta$ . At present, no BACE mutations in FAD cases have been found (Cruts et al., 2001; Nicolaou et al., 2001) but increased expression of BACE1 was reported in the cortex of sporadic AD patients (Holsinger et al., 2002; Yang et al., 2003). The mechanism by which BACE levels are increased in some sporadic AD cases is not known, but a possibility exists that this elevation could be mediated through

the NF $\kappa$ B, which is an oxidative stress-responsive transcription factor (Lezoualc'h et al., 2000). Analysis performed with Proscan and Transcription Factor Search (TFsearch) software, predicted that the promoter region of presenilin 1 and BACE1 have an NF $\kappa$ B site. As has been mentioned, diverse works have examined the role of oxidative stress on activation of BACE1-mediated pathway (Tong et al., 2005; Tamagno et al., 2005, 2008a). In agreement with these reports, we observed an increase in BACE1 levels revealed by Western blot and by immunocytochemistry. Moreover, from the experiments of appearance of the p-epitope Thr668, we observed the accumulation of the residue p-C99, which is indicative of highly processed APP, mainly directed by BACE1.

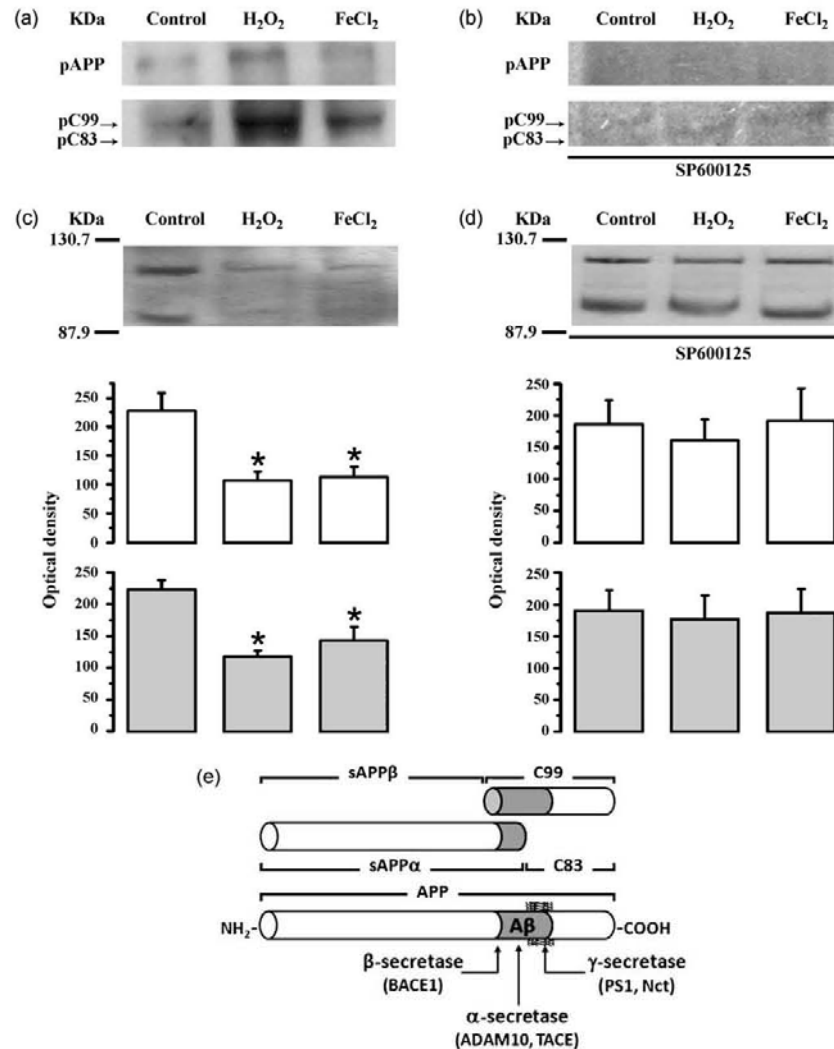


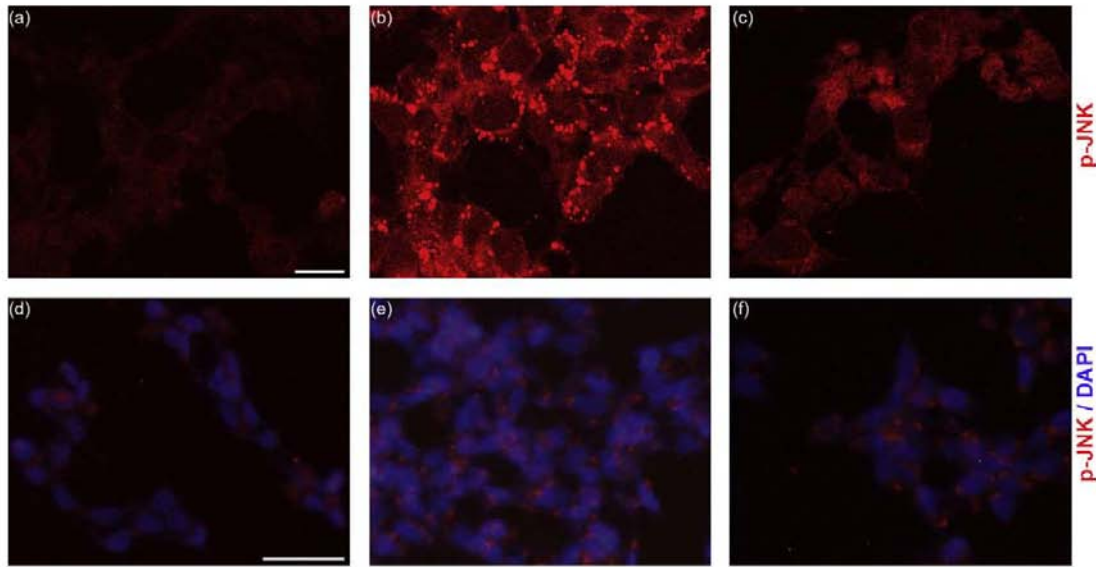
Fig. 5. Participation of JNK on the phosphorylation of APP at Thr668. Representative Western blots of MSN cells, which show the expression of full-length phospho-APP and phospho-C99 in absence (a) or presence (b) of JNK inhibitor SP600125 (5  $\mu$ M). Densitometric analysis and representative Western blots of the total levels of full-length APP (top band) and sAPP $\alpha$  (bottom band) in absence (c) or presence (d) of SP600125. A scheme of the APP-processing with  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -secretase cutting point is shown (e). Densitometric analysis values are expressed as the arbitrary optical density units (ODU) mean  $\pm$  SEM of 4 independent determinations performed in duplicate. Control \* $p$  < 0.05.

The main phosphorylation site of APP is Thr668 located in the cytoplasmic region. The physiological phosphorylation state of APP at Thr668 is observed in dividing neuron cells, and in stressed cells (for revision Suzuki and Nakaya, 2008). Concomitant with the differential regulation of protein levels of different secretases, we found evidence that the up-regulation of pThr668 is mediated by JNK during oxidative stress, and may participate in the endoproteolytic cleavage of APP by BACE1. The pharmacological inhibition of JNK inhibited both: Thr668 phosphorylation, as well as the reduction of APP. These results together with the finding that JNK is activated and translated into the nucleus are supportive of JNK participation of A $\beta$  generation from the amyloidogenic pathway.

Although much evidence points to a link between Thr668 phosphorylation of APP and A $\beta$  level (Ando et al., 2001; Lee et al., 2003; Akiyama et al., 2005), other studies on Thr668-APP

phosphorylation did not find a mechanistic link (Sano et al., 2006). Therefore, it is likely that two alternative APP-processing pathways, i.e. the Thr668 phosphorylation-dependent and -independent pathways, may exist to produce A $\beta$  as suggested previously (Shin et al., 2007). However, in the present work, the strong Thr668 phosphorylation accumulated in the C99 APP endoproteolytic fragment points to BACE1 activation as the main cause of pro-amyloidogenic processing of APP during oxidative stress as shown in the scheme of the APP cleavage processing with  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -secretase cutting point (Fig. 5e).

In sum, results of the present work complement recent reports and add new insights into the role of oxidative stress in the misprocessing of APP in human neuroblastoma cells that trigger down-regulation of  $\alpha$ -secretase enzymes, and up-regulation of  $\gamma$ -secretase, and particularly of  $\beta$ -secretase depending on the activation of JNK.



**Fig. 6.** Exposure of MSN cells to  $H_2O_2$  and  $FeCl_2$  alters p-JNK staining and the cellular localization of active-JNK (a) Control neurons showing moderate p-JNK immunoreactivity localized to processes and cell bodies. Treatment of the neurons with (b)  $H_2O_2$  and (c)  $FeCl_2$  induce an intense p-JNK staining covering the cell soma and nuclei. Nuclear translocation of p-JNK was visualized by immunostaining MSN cells with a p-JNK antibody (red) and labeling all cell nuclei with DAPI (blue) in control neurons (d) and after  $H_2O_2$  (e) and  $FeCl_2$  (f). Representative images from quadruplicate experiments. Scale bars = 20  $\mu$ m (a–c) and 50  $\mu$ m (d–f).

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. A. Zepeda for valuable assistant with confocal microscopy experiments, P. Ferrera for excellent technical assistance and I. Pérez-Montfort for revision of the English manuscript. R. Quiroz-Baez was supported by a fellowship from CONACyT (186640) and DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by grants from UNAM (PAPIIT IN217806) and CONACyT (48663).

#### References

- Akiyama, H., Shin, R.W., Uchida, C., Kitamoto, T., Uchida, T., 2005. Pin1 promotes production of Alzheimer's amyloid  $\beta$  from  $\beta$ -cleaved amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 521–529.
- Ando, K., Iijima, K.I., Elliott, J.L., Kirino, Y., Suzuki, T., 2001. Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of  $\beta$ -amyloid. *J. Biol. Chem.* 276, 40353–40361.
- Asai, M., Hattori, C., Szabo, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., Ishiura, S., 2003. Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP  $\alpha$ -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 231–235.
- Behl, C., Moosmann, B., 2002. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 182–191.
- Butterfield, D.A., 2002. Amyloid  $\beta$ -peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* 36, 1307–1313.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., Black, R.A., 1998. Evidence that tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273, 27765–27767.
- Cecchi, C., Fiorillo, C., Sorbi, S., Latorraca, S., Nacmias, B., Bagnoli, S., Nassi, P., Liguri, G., 2002. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1372–1379.
- Cruts, M., Dermaut, B., Rademakers, R., Roks, G., Van den Broeck, M., Munteanu, G., van Duijn, C.M., Van Broeckhoven, C., 2001. Amyloid  $\beta$  secretase gene (BACE) is neither mutated in nor associated with early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 313, 105–107.
- Esler, W.P., Wolfe, M.S., 2001. A portrait of Alzheimer secretases—new features and familiar faces. *Science* 293, 1449–1454.
- Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiesch, R., Ruble, C., Nye, J.S., Curtis, D., 2002. *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling,  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\beta$ APP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* 3, 85–97.

- Fukumoto, H., Cheung, B.S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C., 2002.  $\beta$ -secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 59, 1381–1389.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 31, 45–80.
- Hardy, J., 2006. Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr. Alzheimer Res.* 3, 71–73.
- Hernández-Ortega, K., Ferrera, P., Arias, C., 2007. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J. Neurosci.* 27, 1744–1751.
- Holsinger, R.M., McLean, C.A., Beyreuther, K., Masters, C.L., Evin, G., 2002. Increased expression of the amyloid precursor  $\beta$ -secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 51, 783–786.
- Huang, X., Cuajungco, M.P., Atwood, C.S., Hartshorn, M.A., Tyndall, J.D., Hanson, G.R., Stokes, K.C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L.E., Scarpa, R.C., Saunders, A.J., Lim, J., Moir, R.D., Glabe, C., Bowden, E.F., Masters, C.L., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., Bush, A.L., 1999. Cu(II) potentiation of Alzheimer  $\alpha$  neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J. Biol. Chem.* 274, 37111–37116.
- Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Town, T., Flavell, R.A., Selkoe, D.J., 2005. Physiological regulation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation. *J. Neurosci.* 25, 5533–5543.
- Lee, H.G., Castellani, R.J., Zhu, X., Perry, G., Smith, M.A., 2005. Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease: the horse or the cart? Pathogenic or protective? *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 133–138.
- Lee, V.M., Quinn, P.A., Jennings, S.C., 2003. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* 41, 925–931.
- Lemere, C.A., Lopera, F., Kosik, K.S., Lendon, C.L., Ossa, J., Saido, T.C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J.C., Anthony, D.C., Koo, E.H., Goate, A.M., Selkoe, D.J., Arango, J.C., 1996. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased  $A\beta_{42}$  deposition and severe cerebellar pathology. *Nat. Med.* 2, 1146–1150.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K.A., Weber, J.L., Bird, T.D., Schellenberg, G.D., 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970–973.
- Lezoualc'h, F., Engert, S., Berning, B., Behl, C., 2000. Corticotropin-releasing hormone-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with the increased release of non-amyloidogenic amyloid  $\beta$  precursor protein and with the suppression of nuclear factor- $\kappa$ B. *Mol. Endocrinol.* 14, 147–159.
- Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., Wewer, U.M., 1999. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J. Biol. Chem.* 274, 13427–13433.

- Marlow, L., Canet, R.M., Haugabook, S.J., Hardy, J.A., Lahiri, D.K., Sambamurti, K., 2003. APH1, PEN2, and Nicastrin increase A $\beta$  levels and  $\gamma$ -secretase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 502–509.
- Marshall, A.J., Rattray, M., Vaughan, P.F., 2006. Chronic hypoxia in the human neuroblastoma SH-SY5Y causes reduced expression of the putative  $\alpha$ -secretases, ADAM10 and TACE, without altering their mRNA levels. *Brain Res.* 1099, 18–24.
- Matsui, T., Ingelsson, M., Fukumoto, H., Ramasamy, K., Kowa, H., Frosch, M.P., Irizarry, M.C., Hyman, B.T., 2007. Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1161, 116–123.
- Montine, T.J., Montine, K.S., McMahan, W., Markesbery, W.R., Quinn, J.F., Morrow, J.D., 2005. F2-isoprostanes in Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 269–275.
- Nicolaou, M., Song, Y.Q., Sato, C.A., Orlacchio, A., Kawarai, T., Medeiros, H., Liang, Y., Sorbi, S., Richard, E., Rogaeve, E.I., Moliaka, Y., Bruni, A.C., Jorge, R., Percy, M., Duara, R., Farrer, L.A., St Georg-Hyslop, P., Rogaeve, E.A., 2001. Mutations in the open reading frame of the  $\beta$ -site APP cleaving enzyme (BACE) locus are not a common cause of Alzheimer's disease. *Neurogenetics* 3, 203–206.
- Numomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E.K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C.S., Petersen, R.B., Smith, M.A., 2001. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 759–767.
- Numomura, A., Perry, G., Pappolla, M.A., Friedland, R.P., Hirai, K., Chiba, S., Smith, M.A., 2000. Neuronal oxidative stress precedes amyloid- $\beta$  deposition in Down syndrome. *J. Neurochem. Exp. Neurol.* 59, 1011–1017.
- Numomura, A., Perry, G., Pappolla, M.A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S., Smith, M.A., 1999. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 19, 1959–1964.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., Hooper, N.M., 1998. Alzheimer's amyloid precursor protein  $\alpha$ -secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase. *Biochemistry* 37, 1680–1685.
- Praticò, D., Clark, C.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Rokach, J., FitzGerald, G.A., 2000. Increased 8,12-iso- $\text{IPF2}\alpha\text{-VI}$  in Alzheimer's disease: correlation of a non-invasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann. Neurol.* 48, 809–812.
- Praticò, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2001. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J. Neurosci.* 21, 4183–4187.
- Reynolds, C.P., Biedler, J.L., Spengler, B.A., 1986. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 375–387.
- Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeve, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775–778.
- Saido, T.C., Yokota, M., Maruyama, K., Yamao-Harigaya, W., Tani, E., Ihara, Y., Kawashima, S., 1994. Spatial resolution of the primary  $\beta$ -amyloidogenic process induced in postischemic hippocampus. *J. Biol. Chem.* 269, 15253–15257.
- Sano, Y., Nakaya, T., Pedrini, S., Takeda, S., Iijima-Ando, K., Iijima, K., Mathews, P.M., Itohara, S., Gandy, S., Suzuki, T., 2006. Physiological mouse brain A $\beta$  levels are not related to the phosphorylation state of threonine-668 of Alzheimer's APP. *PLoS One* 20, e51.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S., 1996. Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864–870.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Selkoe, D.J., 2003. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem. Res.* 28, 1705–1713.
- Shen, C., Chen, Y., Liu, H., Zhang, K., Zhang, T., Lin, A., Jing, N., 2008. Hydrogen peroxide promotes A $\beta$  production through JNK-dependent activation of  $\gamma$ -secretase. *J. Biol. Chem.* 283, 17721–17730.
- Sherrington, R., Rogaeve, E.I., Liang, Y., Rogaeve, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760.
- Shimyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., Sugimoto, H., 2008. Multifunction of myricetin on A $\beta$ : neuroprotection via a conformational change of A $\beta$  and reduction of A $\beta$  via the interference of secretases. *J. Neurosci. Res.* 86, 368–377.
- Shin, R.W., Ogino, K., Shimabuku, A., Taki, T., Nakashima, H., Ishihara, T., Kitamoto, T., 2007. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Thr668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of A $\beta$  and tau. *Acta Neuropathol.* 113, 627–636.
- Smith, M.A., Harris, P.L., Sayre, L.M., Perry, G., 1997. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9866–9868.
- Stephenson, D.T., Clemens, J.A., 1998. Metabotropic glutamate receptor activation in vivo induces intraneuronal amyloid immunoreactivity in guinea pig hippocampus. *Neurochem. Int.* 33, 83–93.
- Suzuki, T., Nakaya, T., 2008. Regulation of amyloid  $\beta$ -protein precursor by phosphorylation and protein interactions. *J. Biol. Chem.* 283, 29633–29637.
- Tachida, Y., Nakagawa, K., Saito, T., Saido, T.C., Honda, T., Saito, Y., Murayama, S., Endo, T., Sakaguchi, G., Kato, A., Kitazume, S., Hashimoto, Y., 2008. Interleukin-1 $\beta$  up-regulates TACE to enhance  $\alpha$ -cleavage of APP in neurons: resulting decrease in A $\beta$  production. *J. Neurochem.* 104, 1387–1393.
- Tamagno, E., Guglielmo, M., Aragno, M., Borghi, R., Autelli, R., Giliberto, L., Muraca, G., Danni, O., Zhu, X., Smith, M.A., Perry, G., Jo, D.G., Mattson, M.P., Tabaton, M., 2008a. Oxidative stress activates a positive feedback between the  $\gamma$ - and  $\beta$ -secretase cleavages of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 104, 683–695.
- Tamagno, E., Guglielmo, M., Giliberto, L., Vitali, A., Borghi, R., Autelli, R., Danni, O., Tabaton, M., 2008b. JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1. *Neurobiol. Aging*, in press, corrected proof, available online 6 February, 2008.
- Tamagno, E., Parola, M., Bardini, P., Piccini, A., Borghi, R., Guglielmo, M., Santoro, G., Davit, A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G., Tabaton, M., 2005.  $\beta$ -Site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J. Neurochem.* 92, 628–636.
- Tong, X.K., Nicolakakis, N., Kocharyan, A., Hamel, E., 2005. Vascular remodeling versus amyloid  $\beta$ -induced oxidative stress in the cerebrovascular dysfunctions associated with Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 25, 11165–11174.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Khan, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Joroszinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., 1999.  $\beta$ -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Vellicquette, R.A., O'Connor, T., Vassar, R., 2005. Energy inhibition elevates  $\beta$ -secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.* 25, 10874–10883.
- Webster, N.J., Green, K.N., Settle, V.J., Peers, C., Vaughan, P.F., 2004. Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: no role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways. *Mol. Brain Res.* 130, 161–169.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J., 1999. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* 398, 513–517.
- Yang, L.B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X.L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R., Shen, Y., 2003. Elevated  $\beta$ -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* 9, 3–4.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeve, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaeve, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St George-Hyslop, P., 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and  $\beta$ APP processing. *Nature* 407, 48–54.