



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PROCESAMIENTO AMILOIDOGÉNICO DE LA PROTEÍNA
PRECURSORA DEL AMILOIDE (APP) EN ASTROCITOS. PAPEL DE LAS BALSAS
LIPÍDICAS.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
MARÍA EVANGELINA AVILA MUÑOZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR:
DR. LUIS VACA DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**DR. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CARTA DE ASIGNACIÓN DE JURADO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



PDCB/grad/070/Jur/2015

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **375** del 07 de octubre del 2015, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **MARÍA EVANGELINA ÁVILA MUÑOZ**, con número de cuenta **300012549**, con la tesis titulada: **"ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PROCESAMIENTO AMILOIDOGÉNICO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (APP) EN ASTROCITOS. PAPEL DE LAS BALSAS LIPÍDICAS"**, dirigida por la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez.

Presidente: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
Secretario: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
Vocal: Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Vocal: Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo
Vocal: Dra. Angélica Zepeda Rivera

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria a 07 de octubre del 2015


DRA. AUREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA


DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
RESPONSABLE DE ENTIDAD

c.c.p: Expediente alumna
AOR/CRL/aap

Unidad de Posgrado Coordinación del Posgrado en Ciencias Biomédicas Edificio B, 1er. Piso Circuito de Posgrados Cd. Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel: 5623 0222 Ext. 37001
<http://www.pdcB.unam.mx> E-mail: pdcB@unam.mx

A mi padre...

Comenzaste conmigo el camino por el doctorado pero no alcanzaste a verlo culminado. Gracias por siempre estar aunque no estés. Gracias por ser un ejemplo de lo que un ser humano es. Te quiero y te recuerdo siempre...

A mi madre...

Qué sería el paso por esta vida y por el doctorado sin ti. Gracias mamá por tu fortaleza, por tu apoyo, por tu abrazo siempre el más cálido, por tu amor siempre incondicional, por ayudarme a ser una mejor persona y recordarme siempre ser feliz. Te quiero profundamente...

“Fluctuat nec mergitur”

Esta tesis es para ustedes...

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, no hay ni habrá mejor lugar para construirse como científica y ser humano. Al programa de **Doctorado en Ciencias Biomédicas** y a su personal por el apoyo brindado durante el doctorado. Al **CONACYT** (166482) y al **PAPIIT** (IN204212 e IN202615) por la beca otorgada para realizar y finalizar mis estudios de doctorado.

Mi más profundo agradecimiento a mi tutora **Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez** por todas las enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, por su apoyo incondicional y calidez, por su ejemplo como jefa de laboratorio, pero más aún por su ejemplo como ser humano. Siempre le estaré agradecida por confiar en mi y permitirme entrar a su laboratorio, que sin duda es el mejor en el que he estado.

A la **Dra. Angélica Zepeda Rivera** por los consejos académicos y personales siempre tan atinados, por el cariño siempre tan evidente.

A la **QFB Patricia Ferrera Boza** por el apoyo técnico durante todo el doctorado, a la **M. en C. Guadalupe Domínguez Macouzet** por el apoyo en el montaje del cultivo primario de astrocitos, y a todos los que de una u otra manera ayudaron al desarrollo técnico y metodológico de esta tesis, en especial al **Dr. Mauricio Olgún Albuerne**.

A los miembros de mi comité tutorial **Dr. Luis Vaca Domínguez** y **Dr. Javier Espinosa Aguirre** por enriquecer con sus conocimientos el presente trabajo y por contribuir de manera fundamental en mi formación como doctora en ciencias, siendo siempre una persona crítica, congruente y responsable. Dr. Javier Espinosa Aguirre, muchas gracias por contribuir en mi amor a la ciencia desde mis años en el CCH Sur, le tengo un gran aprecio.

A los miembros del jurado: **Dra. Lourdes Massieu Trigo**, **Dr. Julio Morán Andrade**, **Dr. Luis Bernardo Tovar** y **Dra. Angélica Zepeda Rivera** por los comentarios y sugerencias que hicieron de esta una mejor tesis.

A mi **familia** (a todos y cada uno de ellos) por el apoyo, desde siempre han sido parte importante en mi crecimiento académico y personal. Gracias **Abe**, en especial por estos últimos meses en que tu apoyo y cariño han sido fundamentales para concluir con esta etapa. Gracias **Che**, que sin tu ayuda no hubiera podido asistir a congresos que aportaron de manera importante a mi formación.

A mis **compañeros del laboratorio (Bert, Ferchi, Abrili, Martis, Manueli, Césarini, Lizbe, G-brain, Rod, Sinaí, Karis, Hélene, Pame, Isaac)** por todas sus enseñanzas y apoyo, por la paciencia, por las pláticas, por las risas, por los saludos en las mañanas, por las comidas, por los cafés, por las fiestas, por las lágrimas, por los abrazos, por esa motivación en cada uno, por todo lo que los hizo y los hace ser mi segunda familia...

A **Andrea** y **Fer** que se convirtieron en parte importantísima de mi vida, gracias por todo, las palabras se quedan cortas para describir lo que ustedes son para mi y lo mucho que las admiro y amo. Aunque lejos, siempre juntas...

A **Rodrigo** por ser el mejor compañero de viajes y risas, por motivarme a no tener miedo y salir de mi zona de confort. Tú sabes lo que significas para mi ...

A todas esas personas especiales, que han estado y están en mi vida. A las personas que estuvieron en momentos críticos durante esta etapa y que me apoyaron a seguir adelante ya sea con un consejo, una sonrisa o un abrazo siempre sincero. Gracias a mis **amigas de la Fac (Mirni, Maní, Rocío y Moni)** que a pesar de no verlas tanto me han entendido y siempre están ahí, a todos mis **amigos de años**, a los **nuevos amigos**, en fin... a todos los que hacen y han hecho del doctorado una experiencia que me llena el corazón y el cerebro...

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
1.1 Astrocitos en el Sistema Nervioso Central	4
1.1.1 Funciones fisiológicas de los astrocitos	6
1.1.2 Astrocitos y gliosis reactiva	9
1.1.3 Astrocitos y neurodegeneración	12
1.2 Enfermedad de Alzheimer	13
1.2.1 La Proteína Precursora del Amiloide (APP)	14
1.2.2 Procesamiento proteolítico de la APP: vía no amiloidogénica y amiloidogénica	18
• <i>α-secretasa</i>	19
• <i>BACE-1</i>	21
• <i>γ-secretasa</i>	24
• <i>Fragmentos C-terminales o CTFs</i>	25
• <i>Fragmentos solubles: sAPPα y sAPPβ</i>	26
• <i>Dominios intracelulares o AICDs</i>	27
• <i>Péptido β-amiloide o Aβ</i>	27
1.2.3 Factores que modulan el procesamiento amiloidogénico	29
1.2.3.1 Balsas lipídicas y contenido de colesterol	29
• <i>Composición de la membrana celular y de las balsas lipídicas</i>	29
• <i>Colesterol, balsas lipídicas y vía amiloidogénica</i>	34
1.2.3.2 Estrés Oxidante	39
• <i>Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)</i>	39
• <i>Estrés oxidante y vía amiloidogénica</i>	41
1.3 Los astrocitos y la enfermedad de Alzheimer	43

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	48
3. HIPÓTESIS	48
4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo general	48
4.2 Objetivos particulares	48
5. MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.1 Materiales y reactivos	49
5.2 Cultivo primario de astrocitos	49
5.3 Tratamientos	50
5.4 Tinción de colesterol	51
5.5 Detección de balsas lipídicas	51
5.6 Western blot	52
5.7 Co-inmunoprecipitación	53
5.8 Inmunofluorescencia	53
5.9 ELISA de A β 42 y A β 40	54
5.10 Medición de ROS por dihidroetidio	54
5.11 Medición de ROS por dihidrorodamina	55
5.12 Análisis estadístico	55
6. RESULTADOS	56
6.1 Caracterización del cultivo primario	56
6.2 El colesterol promueve la formación de balsas lipídicas	57
6.3 El colesterol induce la activación de los astrocitos	58
6.4 El contenido de colesterol modula los niveles de APP	59
6.5 La expresión de APP inducida por colesterol es prevenida por Euk-134	62
6.6 El colesterol incrementa los niveles de BACE-1 y promueve su asociación con APP	64
6.7 El colesterol modula el procesamiento amiloidogénico de APP	66

7. DISCUSIÓN	68
8. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	74
9. PERSPECTIVAS	75
10. REFERENCIAS	79
11. APÉNDICES	112

Avila-Muñoz, E., Arias, C. (2015). Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia*. In press. doi: 10.1002/glia.22874.

Avila-Muñoz, E., Arias, C. (2014). When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* **18**:29-40.

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Funciones fisiológicas de los astrocitos	9
Figura 2. Activación de los astrocitos	12
Figura 3. Marcadores histopatológicos del Alzheimer	14
Figura 4. Dominios y regiones de la familia de APP	16
Figura 5. Procesamiento de APP	19
Figura 6. Estructura de ADAM o α -secretasa	20
Figura 7. Estructura de BACE-1	23
Figura 8. Componentes del complejo de γ -secretasa	25
Figura 9. Fragmentos generados por el procesamiento de APP	29
Figura 10. Modelo del mosaico fluido	30
Figura 11. Balsas lipídicas	31
Figura 12. Estructura del esfingolípido	32
Figura 13. Estructura del colesterol	32
Figura 14. ROS y antioxidantes	40

RESULTADOS

Figura 1. Detección de GFAP y NeuN en el cultivo primario de astrocitos y línea celular MSN	57
Figura 2. Incorporación de colesterol y localización de GM1 en astrocitos	58
Figura 3. El colesterol induce la activación de los astrocitos	59
Figura 4. Efecto del colesterol en los niveles de la APP	61
Figura 5. El efecto del colesterol en los niveles de la proteína APP es	

modulado por la inducción de ROS	63
Figura 6. El colesterol modula los niveles de la proteína BACE-1 y su interacción con APP	65
Figura 7. El colesterol modula el procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la APP	67
RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	74

RESUMEN

El colesterol es esencial en el mantenimiento de la integridad de las balsas lipídicas y ha sido considerado como un factor regulador muy importante para la amiloidogénesis en la enfermedad de Alzheimer (EA). La gran mayoría de los estudios del metabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP) y de la producción de la proteína β -amiloide ($A\beta$) se han enfocado en neuronas. El papel de los astrocitos premanece aún inexplorado a pesar de la presencia de astrocitos activados en los cerebros de la mayoría de los pacientes con EA y en modelos transgénicos de la enfermedad. El papel del colesterol en la producción de $A\beta$ ha sido estudiado ampliamente en neuronas y se le ha atribuido una participación en la formación de las balsas lipídicas y en metabolismo de la APP. De esta manera, en el presente trabajo se estudió el efecto del tratamiento de astrocitos con colesterol y se analizó la expresión y procesamiento de la APP. Se encontró que la exposición al colesterol induce la activación de los astrocitos, incrementando el contenido de APP y aumentando la interacción entre APP y BACE-1. Estos efectos fueron asociados con un enriquecimiento de los dominios de gangliósido GM1-colesterol en la membrana del astrocitos y con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

ABSTRACT

Cholesterol is essential for maintaining lipid raft integrity and has been regarded as a crucial regulatory factor for amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD). The vast majority of studies on amyloid precursor protein (APP) metabolism and amyloid β -protein ($A\beta$) production have focused on neurons. The role of astrocytes remains largely unexplored, despite the presence of activated astrocytes in the brains of most patients with AD and in transgenic models of the disease. The role of cholesterol in $A\beta$ production has been thoroughly studied in neurons and attributed to the participation of lipid rafts in APP metabolism. Thus, in the present study, we analyzed the effect of cholesterol loading in astrocytes and analyzed the expression and processing of APP. We found that cholesterol exposure induced astrocyte activation, increased APP content, and enhanced the interaction of APP with BACE-1. These effects were associated with an enrichment of ganglioside GM1-cholesterol patches in the astrocyte membrane and with increased ROS production.

ABREVIATURAS

A β	Péptido β -amiloide (<i>amyloid-β peptide en inglés</i>)
ADAM	Desintegrina y metaloproteasa (<i>a disintegrin and metalloproteinase en inglés</i>)
APP	Proteína precursora del amiloide (<i>amyloid precursor protein en inglés</i>)
APH1	Proteína defectiva de faringe anterior-1 (<i>anterior pharynx-defective-1 en inglés</i>)
BACE-1	Enzima que corta a APP en sitio beta-1 (<i>beta-site APP-cleaving enzyme 1 en inglés</i>)
CTB	Subunidad beta de la toxina del cólera (<i>cholera toxin subunit B en inglés</i>)
CTFs	Fragmentos C-terminales (<i>C-terminal fragments en inglés</i>)
C-83	Fragmento C-terminal de APP de 83 aa
C-99	Fragmento C-terminal de APP de 99 aa
DRM	Membrana resistente a detergentes (<i>detergent resistant membrane en inglés</i>)
EA	Enfermedad de Alzheimer
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acidic protein en inglés</i>)
GM1	Monosialogangliósido GM1
NPC	Célula precursora neural (<i>neural progenitor cell en inglés</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species en inglés</i>)
sAPP α	Fragmento α -soluble de APP
sAPP β	Fragmento β -soluble de APP
SEM	Error estándar de la media (<i>standard error of the mean en inglés</i>)
PEN-2	Enhancer de presenilina-2 (<i>presenilin enhancer-2 en inglés</i>)

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Astrocitos en el Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central (SNC) se compone de neuronas y células gliales que incluyen a los astrocitos, oligodendrocitos y microglía. La generación de los astrocitos durante el desarrollo tiende a ocurrir después de la producción inicial de neuronas en la mayoría de las regiones del SNC.

Las estimaciones que se han realizado con respecto a la razón glia:neurona en el cerebro varían según el grupo de trabajo (Nedergaard et al., 2003; Allen and Barres, 2009; Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2014). Se ha observado que existen variaciones entre especies y áreas del cerebro (Herculano-Houzel, 2014; Khakh and Sofroniew, 2015). En humanos se ha propuesto que la razón glia:neurona es más alta que en la mayoría de las especies (Bass et al., 1971; Leuba and Garey, 1989; Nedergaard et al., 2003) y se ha estimado que existen 8.4×10^{10} células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) y 8.6×10^{10} células neuronales en todo el cerebro (Azevedo et al., 2009; Herculano-Houzel, 2014). En la corteza cerebral de humanos se ha sugerido que del 20-40% del total de las células gliales son astrocitos (Pelvig et al., 2008; Herculano-Houzel, 2014). En esta área cerebral, los astrocitos son más numerosos que las neuronas, mientras que en el cerebelo las neuronas superan en número a los astrocitos. Los astrocitos son escasos en áreas con alta densidad de cuerpos neuronales como la capa granular cerebelar y la capa de células piramidales del hipocampo, mientras que áreas donde se encuentran dendritas y axones poseen mayor número de astrocitos (Khakh and Sofroniew, 2015).

En el SNC, cada astrocito ocupa un área discreta que se encuentra libre de los procesos de astrocitos adyacentes, lo cual sugiere que los astrocitos poseen dominios espaciales propios, aunque se ha observado que los procesos periféricos pueden interdigitar unos con otros (Ogata and Kosaka, 2002; Bushong et al., 2000; Bushong et al., 2004; Halassa et al., 2007). Dentro del dominio de un astrocito de corteza cerebral e hipocampo de roedor, se pueden encontrar entre 300 y 600 dendritas neuronales (Halassa et al., 2007) y 10^5 sinapsis. En contraste, en la corteza humana, un solo astrocito puede sensor la actividad y regular la función de más de un millón de sinapsis dentro de su

dominio (Oberheim et al., 2006). De esta forma, la distribución de los astrocitos a través del cerebro y la espina dorsal está altamente organizada de tal manera que, los cuerpos celulares y los procesos no se encuentran en contacto unos con otros (Chang-Ling and Stone, 1991). La importancia funcional de estos dominios no se conoce completamente; sin embargo, es posible que todas las sinapsis que se encuentran dentro del dominio de un solo astrocito, estén sólo bajo la influencia de éste (Nedergaard et al., 2003).

Los astrocitos tienen varios subcompartimentos morfológicos o tipos de procesos: 1) ramas (branches en inglés): son los procesos principales que se proyectan desde el soma del astrocito. No sobrepasan de 8 ramas por célula y su diámetro se encuentra en la escala de los micrómetros, 2) ramillas (branchlets en inglés): son estructuras finas de segundo y tercer orden que derivan de las ramas y su diámetro se encuentra en la escala submicrométrica, 3) fascículos (leaflets en inglés): son las extensiones más terminales de las ramillas y hacen contacto con las sinapsis neuronales. No se conoce el número preciso por astrocito pero con base en estudios de microscopía electrónica, se sabe que sus dimensiones se encuentran en el rango de cientos de nanómetros. A estas estructuras también se les ha denominado laminillas, hojas, procesos periféricos, procesos perisinápticos y dedos de astrocitos, y 4) pies terminales (end feet en inglés): son extensiones terminales especializadas que contactan a la vasculatura. Cada astrocito posee una o dos ramas con pies terminales que representan un compartimento especializado y polarizado (Khakh and Sofroniew, 2015).

Con base en la detección de la proteína GFAP (proteína ácida fibrilar glial), que es un marcador de astrocitos (Ludwin et al., 1976; Pekny et al., 1995), se ha dividido a los astrocitos corticales humanos en cuatro morfologías distintas: protoplásmicos, interlaminares, polarizados y fibrosos o fibrilares (Oberheim et al., 2006). Los astrocitos protoplásmicos son el tipo más abundante en la corteza humana encontrándose en las capas 2 a 6. En el humano, el cuerpo celular de estos astrocitos es de ~10 μm de diámetro y sus procesos se extienden de 100-200 μm (27 veces más grandes que los de los roedores) (Cajal, 1995; Oberheim et al., 2006). Los astrocitos interlaminares se extienden en las capas 1, 2 y 4 de la corteza cerebral (Andriezen, 1983; Colombo and Reisin, 2004). Los cuerpos celulares son de ~10 μm de diámetro y extienden dos tipos de procesos: 3-6

fibras que contribuyen a la red de astrocitos cerca de la superficie de la pia madre, y 1-2 fibras que penetran en las capas de la corteza y se extienden aproximadamente 1 mm de longitud (Colombo and Reisin, 2004). Los astrocitos polarizados son relativamente poco comunes y se encuentran presentes en las capas 5 y 6 de la corteza, cerca de la materia blanca (Oberheim et al., 2006). Ocasionalmente extienden sus procesos a la vasculatura, pero la mayoría terminan en el neuropilo (Cajal, 1995). Estos astrocitos no respetan los dominios de los astrocitos vecinos ya que sus largos procesos viajan directamente a través de los dominios protoplásmicos de otros astrocitos. La función de estas células no se conoce del todo, pero posiblemente sirven como una vía alternativa para la comunicación a larga distancia a través de las capas corticales, formando uniones entre dominios funcionalmente relacionados en diferentes capas o entre la materia blanca y la gris. Finalmente, los astrocitos fibrosos se encuentran en la materia blanca y sus procesos pueden sobrelaparse (Oberheim et al., 2006).

Recientemente han surgido estudios a gran escala que analizan el transcriptoma del astrocito y que han reforzado la noción de la diversidad molecular de los astrocitos en diferentes regiones del cerebro, además de que han provisto evidencia de que diferentes estímulos pueden cambiar los perfiles transcripcionales de estas células en diferentes formas, sugiriendo que existe más diversidad de astrocitos de lo que se cree (Bachoo et al., 2004; Cahoy et al., 2008; Hamby et al., 2012; Zamanian et al., 2012; Zhang et al., 2014).

1.1.1 Funciones fisiológicas de los astrocitos

Hasta finales de los años 90's, se creía que los astrocitos actuaban sólo como un sosten físico para las neuronas. Sin embargo, se sabe actualmente que contribuyen en muchos procesos fisiológicos importantes para el mantenimiento y regulación del SNC (Fig. 1). Se ha observado que expresan canales de sodio y potasio, y pueden exhibir corrientes iónicas, aunque a diferencia de las neuronas, no propagan potenciales de acción a lo largo de sus procesos. Esto no significa que los astrocitos sean silentes fisiológicamente, ya que pueden presentar incrementos regulados en la concentración de calcio intracelular, lo cual representa una forma de excitabilidad. Existen varios trabajos que evidencian que estos incrementos de calcio son importantes para la comunicación intercelular astrocito-

astrocito y astrocito-neurona (Charles et al., 1991; Nedergaard et al., 2003; Seifert et al., 2006) y se ha sugerido que participan en el control del diámetro de los vasos sanguíneos, el control de la liberación de factores tróficos y sinaptogénicos, la regulación de la expresión de genes, la modulación de la captura de K^+ , la regulación de la captura de neurotransmisores, el control del movimiento de los procesos de los astrocitos, la ampliación del potencial de acción axonal, la sincronización neuronal y posiblemente la liberación de moléculas y mediadores inflamatorios ante estímulos dañinos (revisado en Zhakh and Sofroniew, 2015). Estas elevaciones de calcio pueden ocurrir como resultado de oscilaciones intrínsecas que resultan de la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares, pueden dispararse por la acción de transmisores (glutamato y purinas) liberados durante la actividad neuronal o pueden ser propagadas por un astrocito vecino (Volterra and Meldolesi, 2005; Halassa et al., 2007; Iadecola and Nedergaard, 2007). Más aún, recientemente se ha propuesto que los astrocitos tienen siete tipos de señalización por calcio que son mediados por diversos estímulos y ocurren en diferentes zonas del cerebro y del propio astrocito (revisado en Zhakh and Sofroniew, 2015).

Los astrocitos también tienen funciones importantes durante el desarrollo de la materia blanca y gris, ya que los límites formados por ellos pueden guiar la migración de los axones y de ciertos neuroblastos durante el desarrollo (Powell and Geller, 1999). Además, estas células gliales forman contactos y tienen múltiples interacciones bidireccionales con los vasos sanguíneos y están involucradas en la regulación del flujo sanguíneo local en el SNC. Existen diversos trabajos que demuestran que los astrocitos pueden producir y liberar moléculas mediadoras como prostaglandinas (PGE), óxido nítrico (NO) y ácido araquidónico (AA) que aumentan o disminuyen, de manera coordinada, el diámetro de los vasos y modulan el flujo sanguíneo en el cerebro en respuesta a la actividad neuronal (Gordon et al., 2007; Iadecola and Nedergaard, 2007; Wolf and Kirchhoff, 2008; Koehler et al., 2009). Asimismo, se sabe que los astrocitos participan en la regulación del metabolismo del SNC ya que los procesos de estas células al tener contacto tanto con los vasos sanguíneos como con los axones y sinapsis neuronales, toman glucosa de la sangre y la almacenan en forma de gránulos de glucógeno. Se ha observado que la utilización de glucógeno astrocítico puede sostener la actividad neuronal durante períodos

de hipoglucemia o cuando se presenta una actividad neuronal muy alta (Brown and Ransom, 2007; Suh et al., 2007). Más aún, los astrocitos forman parte de la barrera hematoencefálica que está constituida por células endoteliales, la lámina basal, pericitos perivasculares y astrocitos. Varias líneas de investigación sugieren que los astrocitos tienen la capacidad de inducir ciertas propiedades de la barrera hematoencefálica mediante moléculas que regulan su maduración, permeabilidad y vasodilatación. Más aún, se ha observado en cultivos celulares que estas moléculas inducen la organización de las células endoteliales en estructuras parecidas a capilares, además del ensamblaje y actividad de sus uniones estrechas (Ballabh et al., 2004; Abbott et al., 2006).

Otro aspecto importante de los astrocitos es que están involucrados en la homeostasis de varios neurotransmisores al expresar niveles altos de transportadores para glutamato, GABA y glicina. Estos transportadores sirven para recapturar los neurotransmisores del espacio sináptico convirtiéndolos, a través de reacciones enzimáticas, en precursores que volverán a dar lugar a los neurotransmisores (Seifert et al., 2006; Sofroniew and Vinters, 2010). Finalmente, otro papel importante de los astrocitos es la protección de las neuronas ante diferentes tipos de daño del SNC, a través de su activación que conlleva cambios morfológicos y fisiológicos, y que ha sido denominada como gliosis reactiva.

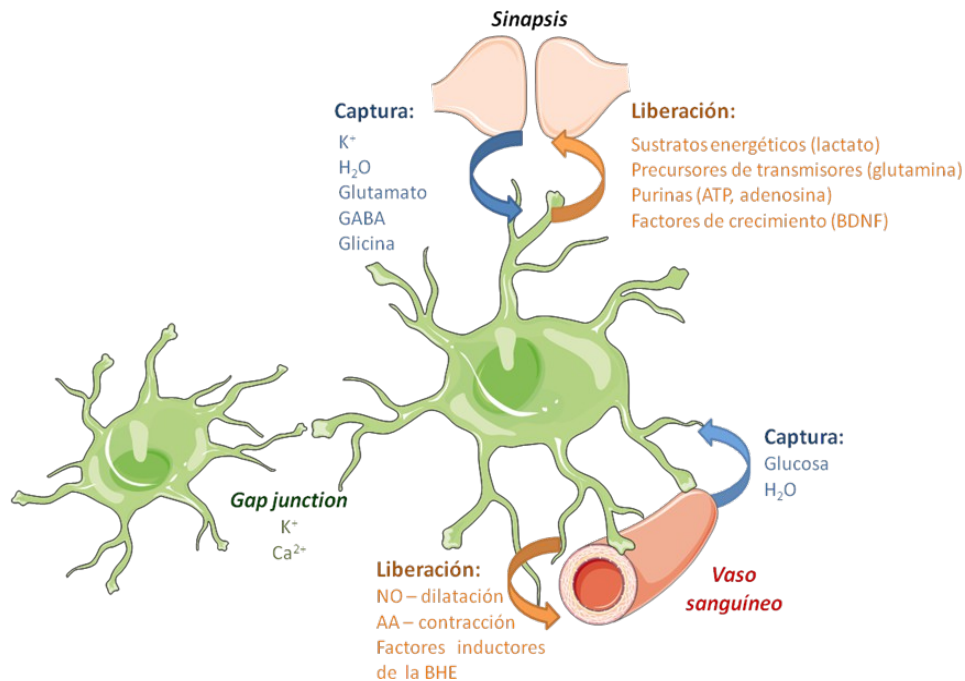


Figura 1. Funciones fisiológicas de los astrocitos. Los astrocitos se comunican unos con otros mediante transientes de calcio intracelular a través de las gap junctions. Están en continua comunicación con las neuronas y en estrecho contacto con la sinapsis en donde capturan y liberan diferentes moléculas para la regulación de la actividad y sobrevivencia neuronal. También forman parte de la barrera hematoencefálica (BHE) y modulan a la microvasculatura a través de la liberación y captura de moléculas que inducen la constricción y dilatación de los vasos sanguíneos o sirven como sustratos energéticos. NO, óxido nítrico; AA, ácido araquidónico.

1.1.2 Astrocitos y gliosis reactiva

En el 2009, Sofroniew definió a la gliosis reactiva basado en cuatro hechos: (1) la gliosis implica cambios moleculares, celulares y funcionales en los astrocitos que ocurren en respuesta a todas las formas y grado de severidad de un daño al SNC, así como a las enfermedades que pueda presentar, (2) los cambios llevados a cabo por los astrocitos activados varían dependiendo de la severidad del daño y la duración del mismo, (3) los cambios que se observan en la gliosis reactiva son regulados de manera dependiente del contexto específico por moléculas de señalización inter e intracelulares.

De acuerdo con esta definición, la activación de los astrocitos no es una respuesta del todo o nada, sino son cambios progresivos tanto celulares como en la expresión genética.

La activación de los astrocitos puede ser clasificada en dos categorías: la primera es benéfica y ocurre poco después del daño al SNC, y la segunda puede ocurrir después,

inhibiendo la regeneración neuronal contribuyendo en el mantenimiento de procesos inflamatorios y por lo tanto ser dañina (Akassoglou et al., 1997; Pekny and Nilsson, 2005).

En cuanto a los cambios morfológicos y proliferativos de los astrocitos, se han definido tres etapas de la gliosis reactiva: 1. *gliosis reactiva media a moderada*, en donde existe un incremento en la expresión de GFAP y algunos genes, y se presenta hipertrofia del cuerpo celular. Se ha observado que los procesos pueden disminuir y existe poca o nada de proliferación. Sin embargo, todo se da dentro de los dominios individuales de los astrocitos sin solapamiento de procesos de astrocitos vecinos o pérdida de los dominios individuales (Wilhelmsson et al., 2006). La astroglia moderada está asociada a un trauma moderado, no penetrante y no contusivo, a una activación difusa del sistema inmune innato y se da en áreas que se encuentran a cierta distancia de lesiones focales. Si el daño es reparado, los astrocitos pueden volver a presentar una apariencia similar al tejido sano (Sofroniew, 2009). 2. *gliosis reactiva severa y difusa*, en donde hay una mayor expresión de GFAP, junto con la hipertrofia del cuerpo celular y de los procesos. Existe proliferación de astrocitos y se observa la extensión de procesos a los dominios de los astrocitos vecinos, lo cual lleva a la reorganización de la citoarquitectura. En áreas que rodean a lesiones focales severas, a infecciones o áreas que responden a procesos neurodegenerativos crónicos, puede encontrarse este tipo de gliosis reactiva. 3. *gliosis reactiva severa con cicatriz glial compacta*, en donde existe proliferación celular y solapamiento de los dominios individuales de los astrocitos, además de la formación de la cicatriz glial. Estas cicatrices pueden actuar como barreras neuroprotectoras contra agentes infecciosos y células inflamatorias, y se forman en los bordes de tejidos con daño severo, necrosis, infección o inflamación. En estas cicatrices, los astrocitos interactúan con células fibromeningeales y otros astrocitos, llevando a la generación de depósitos densos de matriz extracelular de colágeno y la producción de moléculas como tenacina-c, proteoglicano de condroitin sulfato y metaloproteasas, que pueden inducir la inhibición de la migración axonal y celular (Fawcett and Asher, 1999; Yiu and He, 2006). De esta manera, los astrocitos rodean y aíslan a las neuronas que murieron o están por morir de las neuronas sanas, previniendo la progresión del daño al tejido, pero impidiendo finalmente la recuperación funcional (Silver and Miller, 2004). Existen al menos dos fuentes de

astrocitos para la formación de la cicatriz glial: 1) astrocitos perivasculares maduros que proliferan localmente y 2) progenitores neurales periependimales que migran al sitio de la lesión (Barnabé-Heider et al., 2010; Bardehle et al., 2013; Benner et al., 2013).

De acuerdo con la distancia a la cual se encuentran los astrocitos del sitio de la lesión, la gliosis se puede clasificar en anisomórfica, donde los astrocitos rodean la lesión formando la cicatriz glial, o isomórfica en la cual los astrocitos permanecen distales al sitio del daño promoviendo el crecimiento neurítico y facilitando la sinaptogénesis. Ambos tipos de gliosis pueden presentarse después de un daño (Mansour et al., 1990). Se ha determinado que dependiendo del tipo de lesión es la respuesta y los cambios consecuentes que se llevan a cabo en el astrocito. Por ejemplo, los cambios inducidos por la isquemia difieren sustancialmente de los observados con la inflamación (Hamby et al., 2012; Zamanian et al., 2012) y los cambios inducidos por eventos de trauma exhiben gradientes que varían con la distancia de la lesión y con la intensidad del daño (Sofroniew and Vinters, 2010; Wanner et al., 2013). Más aún, la diversidad de respuestas no solo difiere dependiendo del tipo de daño, sino también entre regiones del SNC como la corteza o el hipocampo (Hamby et al., 2012; Wanner et al., 2013; Anderson et al., 2014).

Existen diferentes moléculas de señalización intercelular que son capaces de desencadenar o regular la gliosis reactiva (Fig.2), entre las que se encuentran: 1) factores de crecimiento polipeptídicos y citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-10, TGF- β ; 2) mediadores de la inmunidad innata como el lipopolisacárido (LPS) y otros ligandos de los receptores tipo Toll; 3) neurotransmisores como el glutamato y la noradrenalina; 4) purinas como el ATP; 5) especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyendo al óxido nítrico (NO); 6) la hipoxia y la falta de glucosa; 7) productos asociados a la neurodegeneración como el A β ; 8) moléculas asociadas con toxicidad metabólica sistémica como el NH₄⁺ y 9) reguladores de la proliferación celular como la endotelina-1. Estos mediadores de la gliosis reactiva pueden ser liberados por neuronas, microglía, oligodendrocitos, pericitos, células endoteliales y otros astrocitos en respuesta a cualquier daño al SNC o durante procesos de neurodegeneración (Sofroniew, 2009).

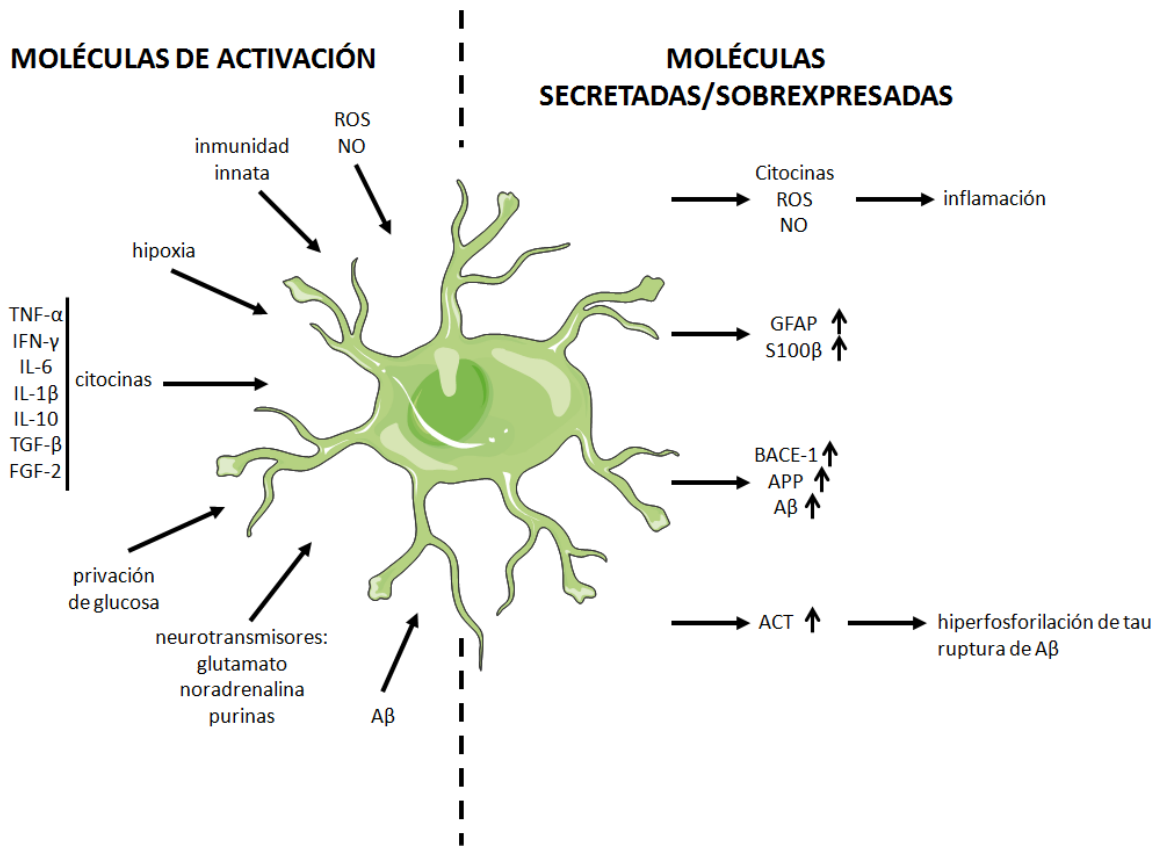


Figura 2. Activación de los astrocitos. Existen diversas moléculas que pueden inducir la activación de los astrocitos como: las especies reactivas de oxígeno (ROS), el óxido nítrico (NO), citocinas, neurotransmisores, el péptido amiloide (A β), la inmunidad innata, procesos de hipoxia y la privación de la glucosa. Una vez activados, los astrocitos pueden liberar una serie de moléculas que van a mediar la expresión de distintas proteínas que están involucradas en la neuroinflamación y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Modificada de Avila-Muñoz and Arias, 2014).

1.1.3 Astrocitos y neurodegeneración

Los astrocitos son esenciales para el funcionamiento normal del cerebro, por lo tanto, la desregulación de sus funciones y la consecuente pérdida de la homeostasis es un componente de la mayoría de las patologías y enfermedades neurológicas. En gran medida, los cambios patogénicos en la glía, determinan el resultado y la escala de las enfermedades del SNC. La contribución de los astrocitos a las patologías está representada por la gliosis reactiva ya sea crónica o aguda que está asociada a la pérdida o alteración de sus funciones esenciales. La atrofia morfológica o la astenia funcional de estas células ha sido descrita en muchas de las condiciones neurológicas (Verkhatsky et al., 2014).

Diversos estudios sugieren que los astrocitos activados contribuyen a la inflamación observada después de un evento de trauma, de una infección o en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y la enfermedad de Alzheimer (Fig.2) (Brenner et al., 2001; Moynagh, 2005; Rossi et al., 2008; Glass et al., 2010; Li et al., 2011; Jo et al., 2014).

1.2 Enfermedad de Alzheimer

En 1907, Alois Alzheimer, psiquiatra y neuropatólogo alemán, describió los hallazgos clínicos y patológicos que encontró en una mujer de 51 años de edad que llevaba cuatro y medio años de demencia progresiva. Estos hallazgos fueron reconocidos como un desorden que fue denominado posteriormente con el nombre de su descubridor (Alzheimer) por el psiquiatra Emil Kraepelin en 1910.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en personas de edad avanzada representando del 60 al 70% de los casos (WHO, 2012). Se ha estimado que la tasa de incidencia de la demencia se doblará cada 20 años hasta alcanzar los 65.7 millones en el año 2030, mientras que para la enfermedad de Alzheimer la tasa de prevalencia asociada a la edad se doblará cada cinco años en pacientes con más de 65 años (Bachman et al., 1993; WHO, 2012).

La progresión de la EA es estereotípica debido a que se ha observado que inicia en la corteza entorrinal, el núcleo basal de Meynert y el núcleo coeruleus, progresando hacia el hipocampo para después afectar el resto de la corteza cerebral (Arendt et al., 2015). En el 95% de los casos de EA el padecimiento se presenta de manera esporádica, siendo el envejecimiento el principal factor de riesgo, mientras que el 5% restante de los casos es debido a la presencia de mutaciones en distintas proteínas y se denomina Alzheimer familiar (FAD). Estas mutaciones son autosómicas dominantes y fueron descubiertas en tres genes diferentes: APP, presenilina-1 y presenilina-2. La mayoría de estas mutaciones alteran la producción de A β acelerando la patología (Guo et al., 2012). La EA se caracteriza histopatológicamente por la presencia de placas amiloideas y marañas neurofibrilares (Fig. 3), que están aumentadas principalmente en corteza e hipocampo de pacientes con la

enfermedad; además de la pérdida sináptica y la muerte neuronal (Hardy and Selkoe, 2002).

Las marañas neurofibrilares están compuestas por la proteína Tau que de manera normal se une a los microtúbulos estabilizando el citoesqueleto neuronal. En la EA, la proteína Tau se encuentra hiperfosforilada, lo que ocasiona que no se una a los microtúbulos y en cambio, se una a otras proteínas Tau que también se encuentran hiperfosforiladas. Por su parte, las placas amiloideas son agregados extracelulares compuestos por el péptido β -amiloide ($A\beta$), el cual deriva del corte proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP).

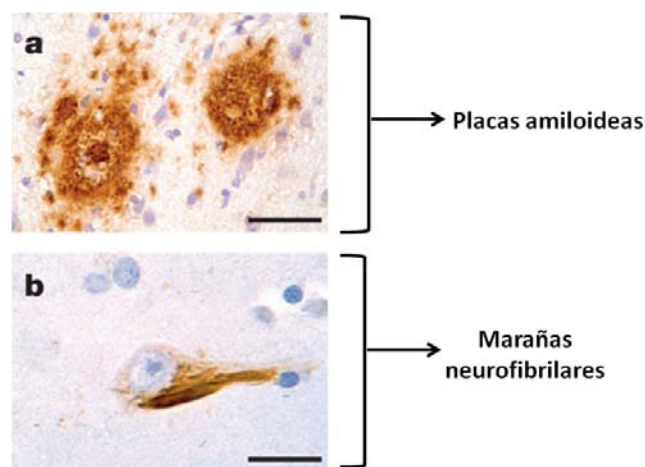


Figura 3. Marcadores histopatológicos del Alzheimer. (a) Placas amiloideas extracelulares compuestas por el péptido β amiloide ($A\beta$). (b) Marañas neurofibrilares intracelulares compuestas por la proteína Tau hiperfosforilada. (Modificado de Jucker and Walker, 2013).

1.2.1 La Proteína Precursora del Amiloide (APP)

La proteína APP forma parte de una familia pequeña de genes (Collin et al., 2004) que incluye a la proteína APL-1 en *C. elegans*, APPL en *Drosophila*, APPa y APPb en pez zebra (Musa et al., 2001), y APLP1 y APLP2 (proteína parecida a la APP 1 y 2) en mamíferos (Anliker and Müller, 2006; Müller and Zheng, 2012). APLP1 se expresa solamente en cerebro mientras que la APLP2 es ubicua.

El gen de la APP se encuentra en el cromosoma 21 y la proteína está codificada por un gen sencillo de 19 exones. Todos los miembros de esta familia codifican a proteínas de membrana tipo I que poseen una región extracelular larga y una región citoplásmica corta.

Estas proteínas están constituidas por diversos dominios (Fig. 4) que incluyen al dominio E1, la región acídica (AcD), el dominio E2 (también llamado dominio central de APP, CAPPD), la región de yuxtamembrana (JMR), la región transmembranal (TM) y el dominio intracelular (AICD para APP y ALID1/ALID2 para APLP1 y APLP2 respectivamente). El dominio de A β y el dominio de extensión (ED) sólo están presentes en la APP, el dominio de inserción KPI/OX2 sólo en la APP y la APLP2 y el dominio E1 está menos conservado en la APLP1. La APP presenta unidades funcionales tales como el dominio de unión a heparina (HBD), el dominio de unión a cobre (CuBD), el dominio de unión a zinc (ZnBD), el dominio de unión a colágeno (CBD) y el dominio parecido a factor de crecimiento (GFLD) (Coburger et al., 2014).

Existen diferentes isoformas de la APP que son resultado del splicing alternativo del exón 7 y 8. Las isoformas predominantes son APP695, 751 y 770, y difieren por la ausencia (APP695) o presencia (APP751 y 770) del dominio extracelular inhibitorio de la proteasa Kunitz (KPI). La APP695 es la isoforma que se encuentra principalmente en neuronas, mientras que la isoforma 770 se expresa en la mayoría de las células. En astrocitos se expresan las isoformas 751 y 770.

La APP se sintetiza en el retículo endoplásmico (RE) y después se transporta mediante la vía secretora. Se modifica postraduccionalmente por la adición de N- y O-oligosacáridos, sulfatación en tirosinas y fosforilación en serinas durante su tránsito por la vía secretora en su camino a la membrana plasmática (Weidemann et al., 1989; Suzuki et al., 1992; Knops et al., 1993; Oishi et al., 1997; Selkoe, 1998). Puede transportarse a lo largo del axón y subsecuentemente por transcitosis se localiza en las dendritas (Koo et al., 1990) y se expone en la membrana plasmática donde alguna se internaliza en endosomas para su reciclamiento. En células en cultivo, se ha observado que además de estar en la membrana, la APP se encuentra en el aparato de Golgi, en la red del trans-Golgi (TGN) y en vesículas del post-TGN. Algunos estudios han propuesto que la APP tiene un tiempo de residencia relativamente corto en la superficie celular ya sea porque es cortada por la α -secretasa o porque es internalizada en endosomas en condiciones normales (Selkoe, 1998; Vetrivel and Thinakaran, 2010).

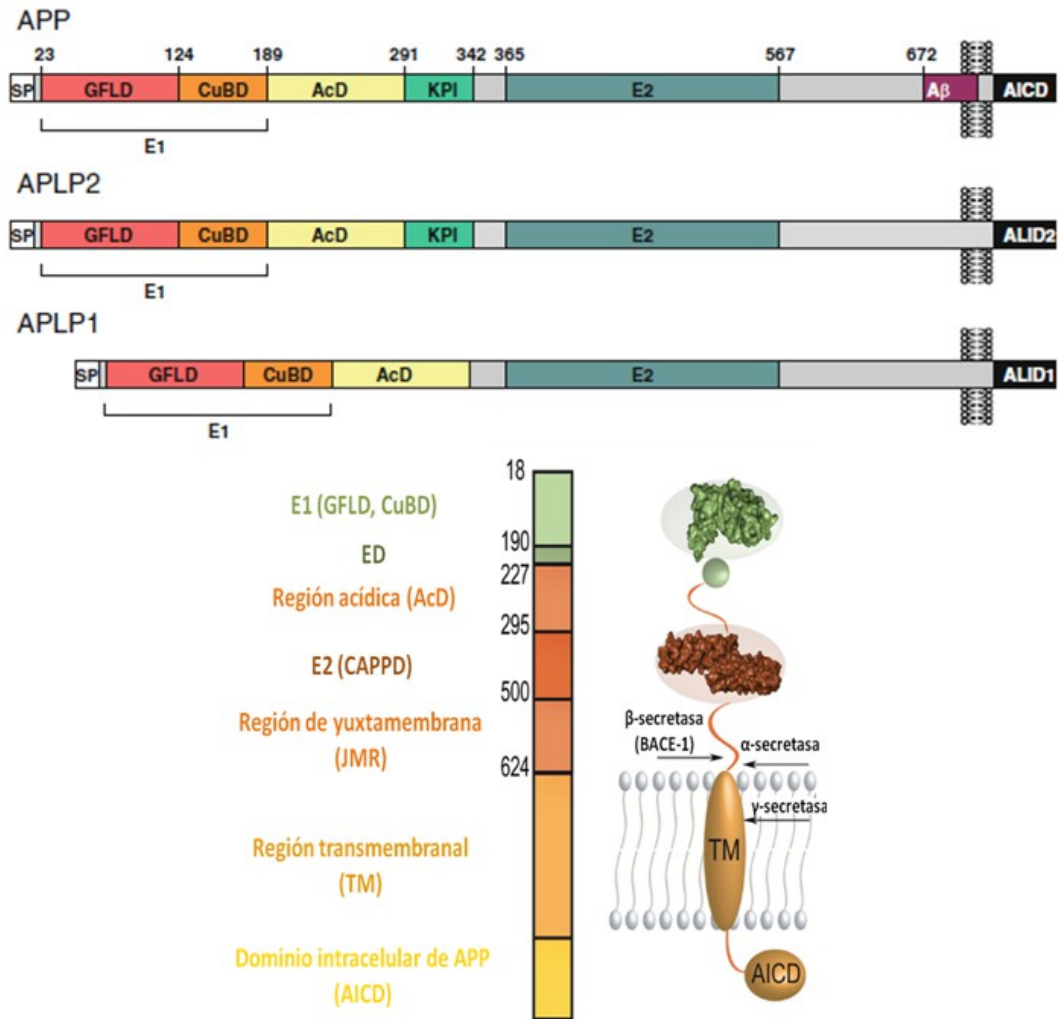


Figura 4. Dominios y regiones de la familia de APP. La APP y su familia están compuestas por diferentes dominios y regiones estructurales y funcionales. (1) Dominio E1: dominio parecido a factor de crecimiento (GFLD) y dominio de unión a cobre (CuBD); (2) Dominio de extensión (ED); (3) Región acídica (AcD); (4) E2 o dominio central de APP (CAPPD); (5) Región de yuxtamembrana (JMR); (6) Región transmembranal (TM); (7) Dominio intracelular de APP (AICD). En el esquema se muestra también el dominio del inhibidor de la proteasa tipo Kunitz (KPI) y el sitio donde se encuentra la región correspondiente al péptido β-amiloide (Aβ). Los sitios de corte por diferentes enzimas (secretasas) se indican con flechas (Aydin et al., 2012; modificada de Coburger et al., 2014).

Estudios en ratones knockout para la APP han demostrado cierta funcionalidad redundante entre ésta y sus proteínas homólogas (Zheng et al., 1995; Dawson et al., 1999). Se ha observado que ratones knockout para la APP presentan un fenotipo normal con defectos sutiles debido a la compensación mediada por la APLP1 y 2, al igual que los ratones dobles transgénicos de la APP con la APLP1 o APLP2. Sin embargo, el triple transgénico presenta letalidad posnatal temprana, lo que sugiere un papel fisiológico de estas proteínas (Von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000). En cuanto a la APP, a pesar de

que su función fisiológica normal aún no es clara, se le han descrito algunas funciones posibles como la regulación del crecimiento neurítico, adhesión celular, sinaptogénesis, sobrevivencia celular y homeostasis del calcio (Thinakaran and Koo, 2008).

La APP es importante durante el desarrollo en ratones, ya que cuando se reducen los niveles de la proteína en la corteza, se afecta la migración de las células precursoras neuronales de la zona ventricular a la corteza y por lo tanto la embriogénesis. La migración puede restablecerse cuando se sobreexpresa a APP695 y APP751 (Young-Pearse et al., 2007). Se sabe que APP puede acoplarse a proteínas motoras de citoesqueleto y filamentos dentro de la célula para unir proteínas de matriz extracelular como el colágeno (Beher et al., 1996), la laminina (Beher et al., 1996), y proteoglicanos de heparina sulfato (Cáceres and Brandan, 1997) y de esta manera regular la migración de las células precursoras. Además, la cola citoplásmica de la APP une proteínas reguladoras de actina como Fe65 y Mena, localizadas en los sitios de adhesión en el cono de crecimiento (Sabo et al., 2003). Más aún, se ha observado que APP se expresa en altas concentraciones en la glía radial, la cual guía a las neuronas hacia la corteza en el embrión, sugiriendo que la adhesión de las neuronas a las células gliales promovida por APP juega un papel importante en el desarrollo cerebral (Trapp and Hauer, 1994).

El papel de la APP en el desarrollo de mamíferos persiste después del nacimiento y se ha observado un pico en los niveles de esta proteína en la segunda semana postnatal de roedores, lo cual coincide con el tiempo de maduración del cerebro y las conexiones sinápticas (Löffler and Huber, 1992). Además, se ha encontrado a la APP en las sinapsis, donde su procesamiento puede ser regulado por la actividad neuronal (Kamenetz et al., 2003). De hecho, los ratones knockout de APP presentan LTP (long-term potentiation) alterada (Dawson et al., 1999; Priller et al., 2006) y reducción en el número de espinas (Tyan et al., 2012), mientras que la sobreexpresión de la APP en ratones transgénicos incrementa la densidad de espinas (Lee et al., 2010) y en neuronas hipocámpales en cultivo incrementa su respuesta a glutamato (Tominaga-Yoshino et al., 2001). Todos estos datos sugieren una contribución importante de la APP en la formación y mantenimiento de las sinapsis.

1.2.2 Procesamiento proteolítico de la APP: vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica

En individuos sanos, la mayor parte de la APP se corta constitutivamente a la mitad de la secuencia A β por la enzima α -secretasa (TACE / ADAM17 y/o ADAM10) (Fig.4 y 5) a través de la vía no amiloidogénica. La α -secretasa corta a la APP en el dominio luminal, a 16 aminoácidos río abajo del sitio de corte de la enzima β -secretasa (BACE-1), promoviendo la liberación del ectodominio soluble de APP (sAPP α) y la generación de un fragmento C-terminal truncado (α -CTF o C-83) que se corta posteriormente por la γ -secretasa. Debido a que el corte por α -secretasa trunca el N-terminal de A β , la vía no amiloidogénica resulta en la generación de péptidos A β truncados, llamados péptidos p3.

Alternativamente, existe una pequeña porción de APP que se corta a través de la vía amiloidogénica por las enzimas proteolíticas: BACE-1 y γ -secretasa, lo que da como resultado final, la secreción de A β (37-42 aminoácidos). El primer corte por BACE-1 resulta en la liberación de un ectodominio soluble grande (sAPP β) y un fragmento C-terminal que se queda anclado a la membrana (β -CTF o C-99). El segundo corte es mediado por γ -secretasa, la cual corta al β -CTF dentro del dominio transmembranal promoviendo la liberación del péptido A β al medio extracelular. Esta vía se encuentra exacerbada en la EA (De Strooper and Annaert, 2000) (Fig. 5 y 6).

La vía amiloidogénica genera un péptido A β de 40 aminoácidos (1-40) que representa el 90% de la A β producida y un A β de 42 aminoácidos (1-42) que constituye el 10%. Se sabe que las formas largas de A β son más propensas a la agregación rápida, a la oligomerización y a la generación de formas fibrilares, eventos que se piensa son críticos para el desarrollo de la EA. Actualmente se conoce que el procesamiento endocítico de la APP, es aparentemente requerido para la generación de A β (Riddell et al., 2001; Eehalt., 2003). Se sabe que la isoforma APP751 se procesa más eficientemente por la vía no amiloidogénica que la APP695 (Ben Khalifa et al., 2012).

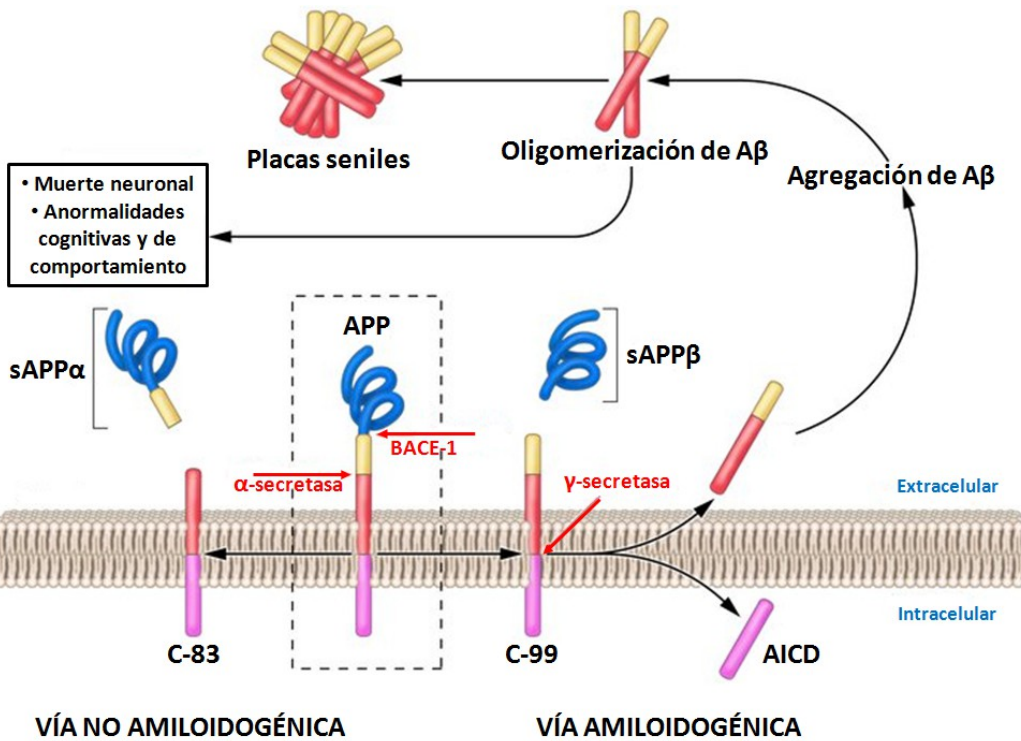


Figura 5. Procesamiento de APP. El procesamiento de APP se lleva a cabo a través de dos vías: La no amiloidogénica y la amiloidogénica. En la no amiloidogénica la APP se corta primero por la α -secretasa generando los fragmentos C-83 y sAPP α , mientras que en la vía amiloidogénica el primer corte se da por BACE-1 que resulta en los fragmentos C-99 y sAPP β . El fragmento C-99 se corta por la γ -secretasa liberando al A β y al fragmento AICD. El A β una vez liberado puede agregarse, oligomerizarse y formar placas seniles (Modificada de Gandy, 2005).

- *α -secretasa*

Las proteínas ADAM (desintegrinas y metaloproteasas) son enzimas dependientes de Zn^{2+} . En el genoma de mamíferos se han identificado 40 ADAMs mientras que en el genoma humano sólo se han descrito 21. Sin embargo, de estas 21 moléculas, solamente 13 son proteolíticamente activas (Edwards et al., 2008).

Las ADAMs están conformadas por varios dominios que incluyen: 1) una secuencia señal seguida de un prodominio que sirve como inhibidor de la enzima durante su traducción y que debe ser cortado por una furina, 2) el dominio catalítico o de metaloenzima, 3) un dominio de desintegrina que sirve para la función de adhesión celular de la enzima, 4) un dominio rico en cisteínas, 5) el dominio transmembranal y 6) una cola citoplásmica que tiene sitios importantes de fosforilación para la unión de proteínas implicadas en vías de señalización (Black et al., 1997; Gooz, 2010) (Fig.6).

Algunas de las ADAMs pierden el dominio de metaloenzima durante la maduración intracelular y algunas no poseen el sitio de unión de zinc presente en el dominio catalítico que les permite ser activas (ADAM 1–7, 22, 23, 29, 31, 32) (Gooz et al., 2010).

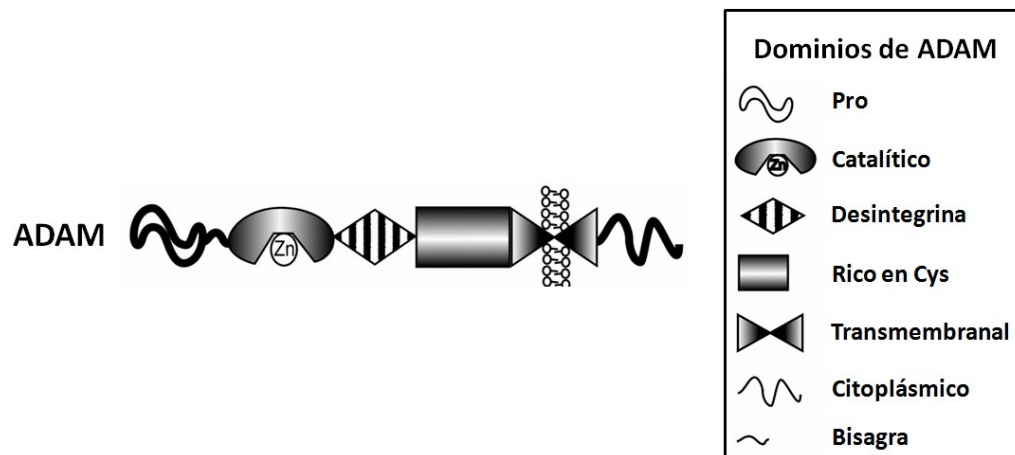


Figura 6. Estructura de ADAM o α -secretasa. La estructura general de las ADAMs, a excepción de las que no poseen el dominio catalítico o la secuencia de unión de zinc, está conformada por un prodominio, el dominio catalítico o de metaloenzima, el dominio de desintegrina, un dominio rico en cisteínas, el dominio transmembranal y el citoplásmico (Modificada de Gooz, 2010).

En general, se ha observado que las ADAMs tienen propiedades tanto adhesivas como proteolíticas y participan en la adhesión celular y el corte de varias moléculas que se encuentran en la superficie celular. Se ha propuesto que actúan como mediadoras de eventos de señalización celular involucrados en diferenciación, proliferación y crecimiento celular (Blobel, 2005; Edwards et al., 2008). En cuanto a las ADAMs sin actividad proteolítica, se sabe que participan en la comunicación intercelular a través de sus propiedades adhesivas, más que activando moléculas de la superficie celular a través de su corte.

Existen tres ADAMs que poseen actividad de α -secretasa: ADAM9, ADAM10 y ADAM17 (también denominada TACE; enzima convertidora del factor de necrosis tumoral) (Sastre et al., 2001; Vincent and Govitrapong, 2011). ADAM17 se expresa ampliamente en varios tejidos que incluyen el cerebro, el corazón, los riñones y el músculo esquelético, y su expresión cambia durante el desarrollo embrionario y durante la etapa adulta (Black et al., 1997). En cuanto al cerebro, se ha observado mediante estudios inmunohistoquímicos y por hibridación *in situ*, que ADAM17 se expresa en células endoteliales y astrocitos

(Goddard et al., 2001). Por su parte, se ha propuesto que ADAM10 se expresa constitutivamente en astrocitos provenientes del cerebro normales y cerebros con procesos inflamatorios (Nuttall et al., 2007).

Tanto ADAM17 como ADAM10, juegan un papel importante en el corte de ectodominios de proteínas inflamatorias. Por ejemplo, el TNF- α soluble es liberado de su precursor, que se encuentra anclado a la membrana, por el corte de ADAM17 (Black et al., 1997). Esta enzima también puede cortar a otros receptores como TNFR y Notch, ligandos de EGFR, moléculas de adhesión como L-selectina y a la APP (Black et al., 1997; Moss et al., 1997; Black and White, 1998; Peschon et al., 1998; Lammich et al., 1999; Reddy et al., 2000; Garton et al., 2003). Una vez cortadas, las moléculas resultantes se pueden unir a sus receptores en la misma célula o en células vecinas, y alternativamente pueden alcanzar células más distantes en el mismo tejido e incluso en el torrente sanguíneo para actuar de manera endócrina (Wiley et al., 1998; Borrell-Pages et al., 2003). En cuanto a sus funciones fisiológicas, se ha propuesto que ambas enzimas están involucradas en el desarrollo del sistema nervioso activando la adhesión de células neurales y el crecimiento de neuritas (Maretzky et al., 2005) y están implicadas en procesos de memoria (Cho et al., 2008; Tanabe et al., 2008).

- *BACE-1*

BACE-1 es una aspartilproteasa de membrana tipo 1 de 501 aminoácidos con actividad de β -secretasa. Fue descubierta entre el año 1999 y 2000 por varios grupos de trabajo que también la nombraron como Asp2 (aspartil proteasa-2) y memapsina 2 (proteasa aspartica anclada a la membrana de la familia de las pepsinas-2) (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Lau et al., 2000). Además de la forma de 501 a.a., existen tres formas derivadas por splicing alternativo de 432, 457 y 476 residuos (Solans et al., 2000).

BACE-1 tiene la capacidad de cortar a la APP y otras proteínas de membrana de tipo1 como: APLP1 y APLP2, β -galactosido α ,2,6-sialiltransferasa, las subunidades β del canal de sodio dependiente de voltaje, el receptor tipo 2 de la interleucina-1 (IL-1R2) y la neuregulina 1 y 3 (Kitazume et al., 2001; Li and Sudhof, 2004; von Arnim et al., 2005; Wong et al., 2005; Kuhn et al., 2007). En cuanto a la APP, el corte por β -secretasa se lleva a cabo

en el Asp+1 y el Glu+11 de la secuencia de A β , lo que hace a esta proteasa altamente específica (Vassar et al., 2009).

BACE-1 se sintetiza como una preproenzima que se corta por una proteasa parecida a furina y posteriormente se transporta a la membrana plasmática a través de la vía secretora, ya que se ha detectado en los compartimentos tardíos de Golgi-TGN. En su paso por estos compartimientos, BACE-1 se N-glicosila en cuatro residuos de Asn y a fosforilación en una Ser; residuos que se encuentran en el dominio citoplásmico (Fig. 7) (Haniu et al., 2000). Esta enzima también puede acetilarse transitoriamente en siete residuos de Arg (Costantini et al., 2007). Posterior a las glicosilaciones y a la fosforilación, BACE-1 se transporta a la membrana celular donde es internalizada posteriormente en endosomas. La fosforilación en el residuo de serina regula su distribución en endosomas tardíos o tempranos (Capell et al., 2000; Huse et al., 2000). La actividad óptima de BACE-1 se ha propuesto que ocurre a pH 4.5 *in vitro*, lo que sugiere a los endosomas como los sitios principales de corte de APP por BACE-1. La endocitosis de APP ha sido propuesta como necesaria para la producción de A β en células en cultivo e *in vivo* (Koo and Squazzo, 1994). Otra modificación postraduccional importante en la maduración de BACE-1 es la S-palmitoilación de cuatro residuos de Cys localizados en la unión del dominio de transmembrana y el citosólico (Fig.7). Esta modificación facilita la localización de BACE-1 en las balsas lipídicas de la membrana donde se ha propuesto que reside esta proteasa (Benjannet et al., 2001; Wolozin, 2001; Tun et al., 2002; Eehalt et al., 2003; Vetrivel et al., 2009). Se sabe que la actividad de BACE-1 es altamente sensible al ambiente lipídico y es estimulada por glucoesfingolípidos, glicerofosfolípidos y esteroides (Kalvodova et al., 2005).

BACE-1 se expresa altamente en el cerebro, principalmente en neuronas (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999; Laird et al., 2005; Harada et al., 2006; Zhao et al., 2007), aunque se ha observado que en modelos animales de gliosis crónica y en cerebros de pacientes con EA hay presencia de BACE-1 en astrocitos (Roßner et al., 2005).

Dentro de las funciones fisiológicas de BACE-1, se ha encontrado que está involucrada en la mielinización del sistema nervioso y se ha sugerido que actúa como una proteína de respuesta a estrés. Se ha observado que BACE-1 incrementa durante eventos de estrés oxidante (Tamagno et al., 2002), hipoxia (Zhang et al., 2007), isquemia (Wen et al., 2004),

apoptosis (Tesco et al., 2007) y daño traumático (Blasko et al., 2004). Durante eventos de estrés oxidante la expresión de BACE-1 se estimula a través de la vía de JNK (cinasa del N-terminal de c-jun) (Tamagano et al., 2008) y del producto de lipoperoxidación 4-hidroxinonenal mediante la vía de la proteína cinasa activada por estrés (Tamagano et al., 2005).

En cerebros de pacientes con EA y en modelos transgénicos de la enfermedad, se ha determinado que los niveles protéicos, el mRNA y la actividad de BACE-1 se encuentran incrementados (Bigl et al., 2000; Fukumoto et al., 2002; Yang et al., 2003; Li et al., 2004). Además, se ha observado que la activación de Cdk5 (cinasa dependiente de ciclina-5), que se sabe está asociada con la EA, aumenta los niveles protéicos y de mRNA de BACE-1 tanto *in vivo* como *in vitro* debido a que incrementa los niveles de STAT3 que interactúa con el promotor de BACE-1 (Wen et al., 2008). Asimismo, se sabe que el knockout de ratón de BACE-1 lleva a la abolición de la producción de A β , sAPP β y C-99, sin embargo, tienen alteraciones fenotípicas como déficits en la potenciación a largo plazo. En estos ratones knockout de BACE-1 existe actividad residual de β -secretasa que puede ser atribuible a su proteína homóloga BACE-2, que aunque se ha descrito principalmente en astrocitos, también se ha encontrado en neuronas y se sabe puede cortar a la APP (Bettegazzi et al., 2011; Vassar, 2003).

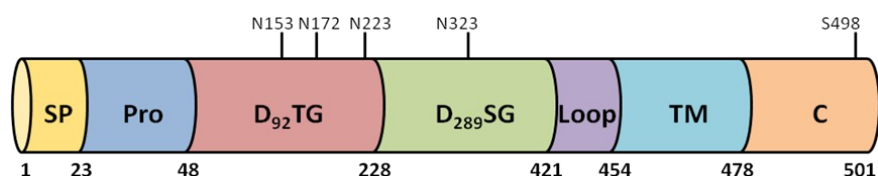


Figura 7. Estructura de BACE-1. Cada dominio está representado por un rectángulo de color con el número de aminoácidos correspondientes. D₉₂TG y D₂₈₉SG son los motivos de ácido aspártico que corresponden a los sitios activos. Juntos componen al dominio catalítico de BACE-1. SP, péptido señal; Pro, propéptido; TM, dominio de transmembrana y C, dominio C-terminal. Los sitios de glicosilación y fosforilación están indicados como Ns y S respectivamente (Modificado de Vassar et al., 2009).

- γ -secretasa

La γ -secretasa corresponde a un complejo multiprotéico formado por cuatro proteínas integrales de membrana: presenilina-1 (PS1), nicastrina, APH1 y PEN2 (Fig. 8). El ensamblaje del complejo comienza con la estabilización de la PS1 por APH1 y nicastrina, que es una glucoproteína de transmembrana tipo 1 que se sugiere como la unidad de unión al sustrato (Satoh and Kuroda, 2001; Shah et al., 2005). Subsecuentemente, PEN2 se une para completar el proceso de ensamblaje y regular la endoproteólisis de PS1 (Luo et al., 2003; Iwatsubo, 2004; Ahn et al., 2010). Estudios mutacionales y con animales knockout y knockdown, han establecido que PS1 es la subunidad catalítica de la γ -secretasa (De Strooper et al., 1998; De Strooper et al., 1999; Wolfe et al., 1999). Una vez sintetizada, PS1 sufre un corte endoproteolítico que resulta en un fragmento amino-terminal (NTF) y un fragmento carboxilo-terminal (CTF) que forman un heterodímero funcional donde se encuentran dos residuos conservados de aspartato que llevan a cabo la actividad catalítica (Borchelt et al., 1996; Li et al., 2000; Kimberly et al., 2003). Además, PS1 ha sido implicada en la regulación del tráfico intracelular (Esselens et al., 2004; Wilson et al., 2004; Wang et al., 2006).

La γ -secretasa, al igual que BACE-1, tiene varios sustratos que son principalmente proteínas de membrana tipo 1 como los receptores y ligandos Notch, el receptor de netrina DCC, el receptor ErbB-4, caderina, LRP y CD44 (revisado en Vetrivel et al., 2006). Esta enzima ha sido detectada en RE, RE-Golgi, Golgi, endosomas, lisosomas, fagosomas, membrana plasmática y mitocondria (Kovacs et al., 1996; Cupers et al., 2001). El corte de varios sustratos por la γ -secretasa parece ser dependiente del compartimento subcelular donde se encuentren, ya que se ha observado que APP es cortada principalmente en TGN y endosomas tempranos, mientras que Notch es cortado en la membrana plasmática (Xu et al., 1997; Greenfield et al., 1999; Tarassishin et al., 2004).

Además del corte en el sitio para la producción de A β 40 y 42, se ha observado que la γ -secretasa media el corte de APP en el sitio ζ y ϵ para generar los péptidos A β 46 y A β 99 respectivamente (Sastre et al., 2001; Weidemann et al., 2002; Zhao et al., 2004; Zhao et al., 2007).

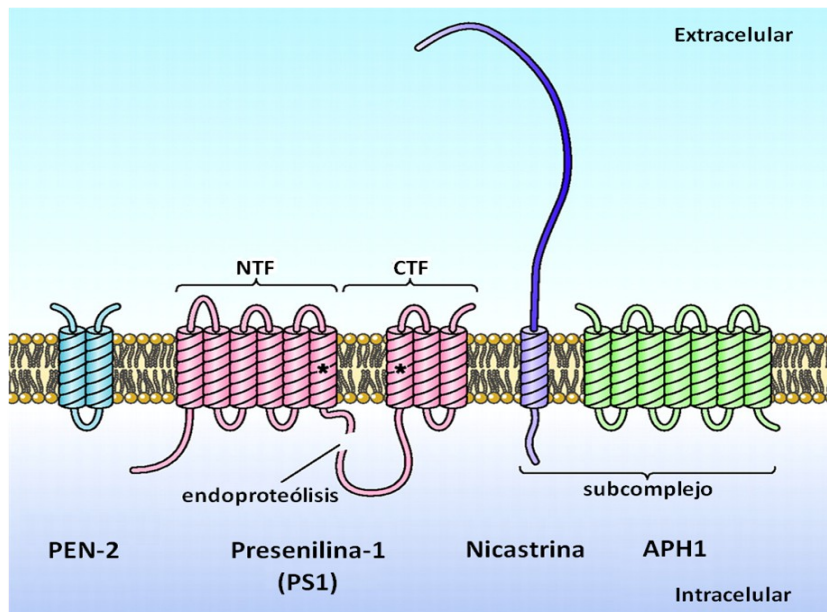


Figura 8. Componentes del complejo de γ -secretasa. La γ -secretasa es un complejo compuesto por cuatro proteínas de membrana: PEN-2, Presenilina-1 (que posee la actividad enzimática del complejo y sufre un corte endoproteolítico para poder llevar a cabo su actividad), Nicastrina y APh-1 (Modificado de Wakabayashi and De Strooper, 2008).

- *Fragmentos C-terminales o CTFs*

Después del corte de APP por α -secretasa o β -secretasa, se generan fragmentos C-terminales (C-83 y C-99 respectivamente) que son relativamente pequeños (Fig.9). Estos fragmentos se quedan anclados a la membrana donde interactúan con varias proteínas adaptadoras y de señalización que contienen dominios de unión a fosfotirosinas (FE65, X11, Dab-1 y JIP-1) o a SH2 (de homología a Src 2) y que se unen de manera dependiente al estado de fosforilación de los CTFs (Lee et al., 2003).

Se sabe que el fragmento C-99 puede contribuir en la neurodegeneración y en la promoción de déficits cognitivos en modelos animales (Lauritzen et al., 2012; Mitani et al., 2012). La sobreexpresión de C-99 ha sido asociada con efectos citotóxicos, posiblemente a través de la alteración de la vía de transducción de señales de la APP (Yankner et al., 1989; Oster-Granite et al., 1996) y se ha observado que está involucrada en la localización de γ -secretasa en la superficie celular (Liu et al., 2009).

- *Fragmentos solubles: sAPP α y sAPP β*

Del corte de la APP, además de los CTFs, se generan fragmentos solubles que dependiendo de si son derivados del corte por la α -secretasa o la β -secretasa, se denominan sAPP α o sAPP β respectivamente (Fig.9). Se ha propuesto que sAPP α actúa como factor de proliferación en precursores neuronales en el cerebro adulto así como en células no neuronales (Saitoh et al., 1989; Pietrzik et al., 1998; Caille' et al., 2004). Además, se ha observado que incrementa el crecimiento neurítico en líneas celulares de neuronas inmortalizadas (Milward et al., 1992) y a nivel de la sinapsis modula la transmisión y actúa como un factor neuroprotector contra el daño isquémico y excitotóxico (Mattson et al., 1993; Smith-Swintosky et al., 1994; Furukawa et al., 1996a,b; Morimoto et al., 1998;). Se sabe que sAPP α induce la diferenciación neural hacia el linaje astrocítico y que su inhibición puede contribuir a la pérdida de espinas dendríticas (Baek et al., 2002; Pardossi-Piquard et al., 2005; Liu et al., 2007; Zhang et al., 2007). Se ha propuesto que su efecto sobre el crecimiento neurítico, lo lleva a cabo a través de su interacción con el receptor de neurotrofina p75 (Hasebe et al., 2013) y a través de la activación de las cinasas MAPK, PI3K y Akt (Cheng et al., 2002). Más aún, puede estimular a la guanilato ciclasa unida a la membrana, regular la homeostasis del calcio, decrementar las corrientes generadas por el receptor NMDA, incrementar la conductancia de los canales de potasio (Barger and Mattson, 1995; Barger et al. 1995) y probablemente, como consecuencia de su papel en la modulación sináptica, mejora el desempeño en tareas de memoria en ratas adultas cuando es inyectado intracerebralmente (Meziane et al., 1998).

En cuanto a la sAPP β , se le ha relacionado con procesos de diferenciación neural de las células madre embrionarias (Freude et al. 2011; Chasseigneaux and Allinquant, 2012). Se ha observado también que decrementa la adhesión celular y aumenta el crecimiento axonal (Chasseigneaux et al., 2011). De igual manera que el sAPP α , puede estimular a la mircroglía (Barger and Harmon, 1997) y cuando existe apoptosis de neuronas periféricas inducida por la privación de factores de crecimiento, la sAPP β se une al receptor DR6 para desencadenar muerte celular (Nikolaev et al., 2009). Comparado con sAPP α , sAPP β es cien veces menos potente en proteger a las neuronas hipocampales en contra de la excitotoxicidad, la toxicidad por A β y la privación de glucosa (Furukawa et al., 1996b).

- *Dominios intracelulares o AICDs*

Estos fragmentos derivan del corte de los CTFs tanto por la vía amiloidogénica como la no amiloidogénica. Se ha propuesto que los AICDs tienen funciones fisiológicas como la modulación de la plasticidad sináptica (Sabo et al., 2003), la vía de señalización de calcio mediada por fosfoinosítidos (Leissring et al., 2002), la apoptosis mediante la regulación de la proteína supresora de tumores p53 (Passer et al., 2000; Kinoshita et al., 2002; Kim et al., 2003; Ozaki et al., 2006; Checler et al., 2007; Nakayama et al., 2008), la dinámica del citoesqueleto de actina (von Rotz et al., 2004; Muller et al., 2007) y la homeostasis del colesterol (Liu et al., 2007) y de los esfingolípidos (Grimm et al., 2011).

Se han identificado varias proteínas como Fe65, JIP y X11/Mint (revisado en De Strooper and Annaert, 2000; King and Scott Turner, 2004) que se unen a motivos de AICD. Por ejemplo, Fe65 se une al motivo YENPTY para formar un complejo que se transloca al núcleo donde posteriormente se une a Tip60. El complejo AICD/Fe65/Tip60 controla la transcripción de varios genes como la neprilisina, el LRP1, el receptor de EGF (Kwak et al., 2006), APP, BACE-1, el propio Tip60, GSK3 β y KAI1 (von Rotz et al., 2004; Muller et al., 2007; Slomnicki and Lesniak 2008). En 2010, Belyaev y colaboradores presentaron un nuevo modelo para la generación de AICDs transcripcionalmente activos. Este modelo propone que solo los AICDs generados durante la vía amiloidogénica poseen actividad transcripcional, mientras que los AICDs generados a través de la vía no amiloidogénica son rápidamente degradados por la enzima degradadora de insulina (IDE). Más aún, sólo el corte de la isoforma APP695 pero no de APP751 o APP770, resulta en AICDs que son activos a nivel transcripcional (Belyaev et al. 2010).

- *Péptido β -amiloide o A β*

El péptido β -amiloide se genera del corte consecutivo de la APP por BACE-1 y posteriormente por la γ -secretasa (Fig.9). A pesar de que la mayoría del A β es secretado fuera de la célula, una porción de este péptido puede ser generado en varios compartimentos celulares como RE, Golgi-TGN y endosomas/lisosomas.

Al péptido A β se le han adjudicado funciones neuroprotectoras y neurotróficas, ya que se ha observado que puede regular la función de canales de calcio (Ramsden et al., 2001, 2002), actuar como factor esencial para la viabilidad de las neuronas (Plant et al., 2003) y

ser secretado por las neuronas en respuesta a actividad sináptica regulando a la baja la transmisión sináptica como una forma de regulación negativa (Kamenetz et al., 2003). Se sabe además, que A β puede entrar a la célula o actuar vía el receptor NMDA, el receptor AMPA, la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, el receptor α 7-nicotínico y el receptor de productos avanzados de glicación (Giri et al. 2000; Bu et al. 2006; Zhao et al. 2010) para llevar a cabo acciones dentro de la célula. Sin embargo, se ha observado que el A β internalizado puede ser también degradado y, bajo ciertas condiciones, puede llegar a acumularse contribuyendo a la patogénesis de la EA (Friedrich et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Los péptidos A β 40 y A β 42 consisten en dos α -hélices que están unidas por un asa. En contraste con el A β soluble, el péptido exhibe un amplio contenido de hojas plegadas- β cuando se encuentra en fibrillas. El cambio conformacional de la estructura α -hélice a hoja plegada- β es fundamental para las propiedades amiloidogénicas del péptido. Los factores desencadenantes de este cambio estructural no son totalmente entendidos. Sin embargo, mutantes que simulan la EA, como las mutaciones alemanas y árticas que están localizadas en la primera α -hélice, causan su desestabilización favoreciendo la conformación de hoja plegada- β y favoreciendo la formación de fibrillas de A β (Levy et al., 1990; Wisniewski et al., 1991). Por otro lado, en cerebros de pacientes con EA, el grado de demencia correlaciona mejor con los niveles cerebrales de A β soluble que con la cantidad de A β agregado en placas (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999). Esto sustenta la noción de que las especies responsables de la disfunción sináptica en los pacientes con EA son los oligómeros solubles de A β , los cuales interfieren con la plasticidad sináptica (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002; Wang et al., 2002), más que los agregados amiloides fibrilares que en un principio fueron considerados como las especies neurotóxicas. Los oligómeros de A β solubles se encuentran presentes a concentraciones más altas en cerebros con EA que en cerebros no afectados (Gong et al., 2003), y se unen específicamente a subpoblaciones de espinas dendríticas (Lacor et al., 2004).

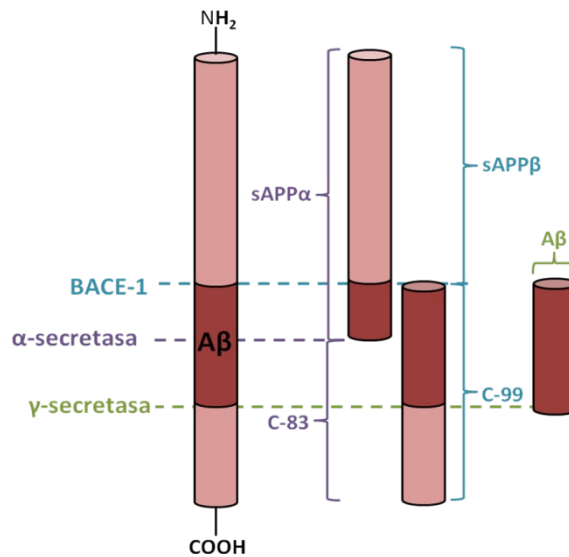


Figura 9. Fragmentos generados por el procesamiento de APP. La APP puede ser cortada por la α -secretasa (en la vía no amiloidogénica) generando dos fragmentos: sAPP α y C-83. Durante la vía amiloidogénica, la APP es primero cortada por BACE-1 dando como resultado dos fragmentos: sAPP β y C-99. El fragmento C-99 es posteriormente cortado por la γ -secretasa para liberar al fragmento A β . En el presente esquema cada enzima y los fragmentos derivados por su corte se presentan en un mismo color (Modificado de Quiroz-Baez et al., 2009).

1.2.3 Factores que modulan el procesamiento amiloidogénico

Además de la edad, se han considerado otros factores de riesgo para el desarrollo de la EA tales como: alteraciones genéticas, polimorfismos, respuesta inmune o inflamatoria anormal, daño traumático, estrés oxidante y alteraciones metabólicas que incluyen la hipercolesterolemia, hipertensión, aterosclerosis, obesidad y diabetes (Hardy, 1997; Small, 1998; Mayeux, 2003). Por otro lado, se ha observado que el consumo de vitaminas relacionadas con la homocisteína (vitamina B12 y folato), antioxidantes (vitamina C y E), ácidos grasos insaturados y fármacos que inhiben la síntesis de colesterol (estatinas) pueden reducir el riesgo de padecer EA (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000; Luchsinger and Mayeux, 2004).

1.2.3.1 Balsas lipídicas y contenido de colesterol

- *Composición de la membrana celular y de las balsas lipídicas*

Las membranas celulares son estructuras dinámicas compuestas por lípidos y proteínas que forman una bicapa con proteínas flotando azarosamente, este modelo de la membrana celular (modelo del mosaico fluido) fue postulado por Singer y Nicolson en 1972 (Fig.10). La membrana celular media la comunicación con el exterior lo que implica

la interacción con células vecinas, hormonas y factores de crecimiento. La bicapa lipídica de las membranas celulares es asimétrica, es decir, posee diferente composición de lípidos en las dos capas que la conforman. Los lípidos presentes en la membrana celular son los fosfolípidos y los glicerofosfolípidos, especialmente la fosfatidilcolina (PC) en la capa exoplásmica y la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS) en la capa interna; así como esfingolípidos y colesterol que se encuentran en ambas capas.

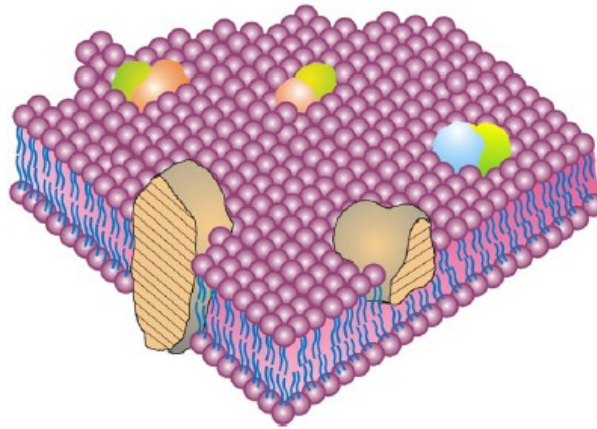


Figura 10. Modelo del mosaico fluido. Modelo de la membrana celular como originalmente fue propuesto por Singer y Nicolson en 1972. Los cuerpos sólidos que atraviesan la bicapa lipídica son proteínas integrales de membrana distribuidas de manera azarosa. Algunas de ellas pueden formar complejos (Nicolson, 2014).

Sin embargo, existen agregados de lípidos en un estado más ordenado dentro del conjunto generalmente desordenado de lípidos de membrana. Estos agregados de lípidos ordenados son actualmente referidos como balsas lipídicas o “lipid rafts”. Las balsas lipídicas están constituidas por esfingolípidos y colesterol, en donde los esfingolípidos se asocian lateralmente unos con otros a través de interacciones débiles (Fig. 11).

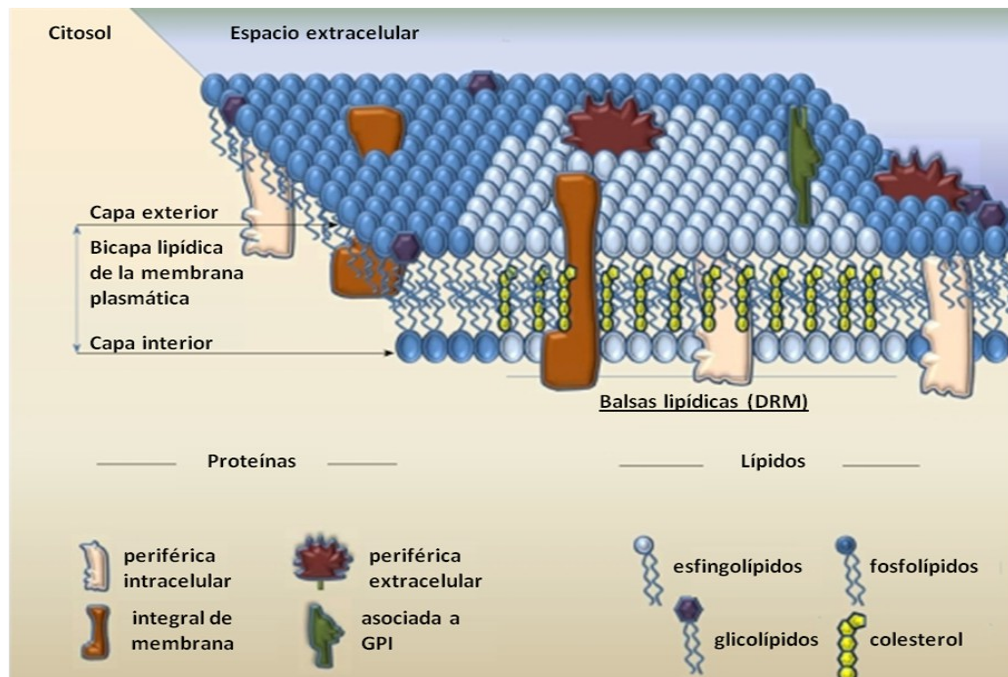


Figura 11. Balsas lipídicas. Las balsas lipídicas son microdominios de membrana compuestos por esfingolípidos y colesterol. Se han estudiado a través de obtención de membranas resistentes a detergentes o DRM (Modificado de Dolganiuc, 2011).

Los esfingolípidos son lípidos de membrana derivados de un aminoalcohol insaturado o esfingosina, el cual se une a un ácido graso de cadena larga por medio de un enlace amina para formar una ceramida (Fig.12). Estos lípidos pueden dividirse en los siguientes grupos: (1) Gangliósidos, son el grupo más complejo de los esfingolípidos y están constituidos por oligosacáridos de ceramidas que incluyen al menos un ácido siálico con carga negativa en la cabeza polar. Constituyen alrededor del 6% de los lípidos del cerebro. (2) Esfingomielinas, son los esfingolípidos más comunes y están constituidas por ceramidas esterificadas con fosfoetanolamina y fosfocolina en la cabeza polar. La mielina que rodea las terminales nerviosas es rica en este tipo de esfingolípidos. (3) Glucoesfingolípidos, se encuentran en la cara externa de la membrana plasmática y se forman cuando las ceramidas se combinan con azúcares. Este grupo no contiene fosfato y se dividen en: cerebrósidos que contienen un azúcar simple unido a la ceramida, y globósidos que tienen dos o más azúcares que son generalmente D-glucosa, D-galactosa o N-acetil-D-galactosamina.

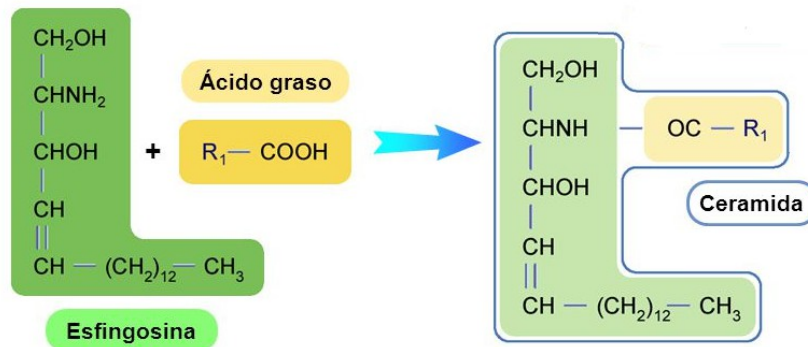


Figura 12. Estructura del esfingolípido. La estructura fundamental de un esfingolípido es una esfingosina unida a un ácido graso de cadena larga mediante un enlace amino para formar una ceramida.

Por otro lado, el colesterol es un tipo de esteroles que posee una cabeza polar constituida por un grupo hidroxilo y una cola apolar constituida por cuatro anillos fusionados, tres de los cuales tienen seis carbonos y uno con cinco carbonos, y una cadena de hidrocarburos (Fig. 13). Este esteroles se sintetiza a partir de acetil-CoA a través de un proceso que se lleva a cabo en cuatro etapas: (1) Condensación de tres unidades de acetato para formar mevalonato, que es un intermediario de seis carbonos; (2) Conversión de mevalonato a unidades activadas de isopreno; (3) Polimerización de seis unidades de isopreno de cinco carbonos para formar el escualeno de 30 carbonos lineales; (4) Ciclización del escualeno para formar los 4 anillos del núcleo. El paso limitante en la biosíntesis del colesterol es la conversión de β -hidroxi- β -metil glutaril-CoA (HMG-CoA) en mevalonato con ayuda de la enzima HMG-CoA reductasa.

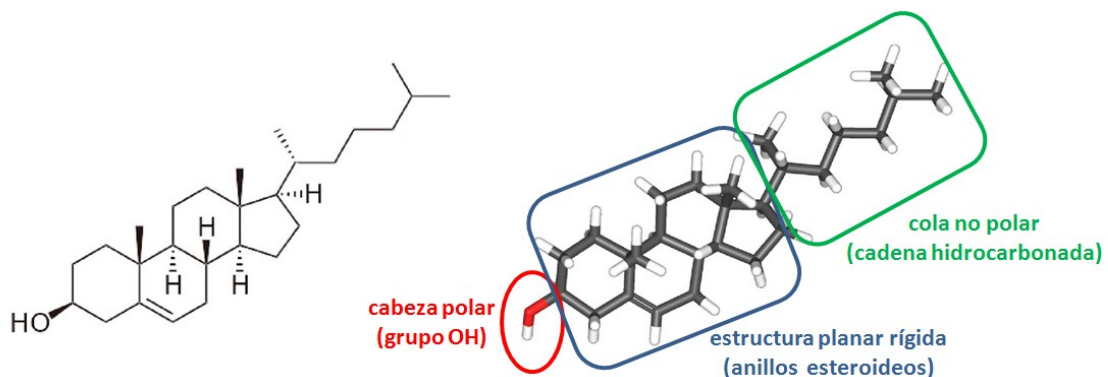


Figura 13. Estructura del colesterol. El colesterol está formado por: (1) una cabeza polar compuesta por el grupo OH; (2) una región rígida constituida por anillos esteroideos; (3) una cola no polar conformada por una cadena hidrocarbonada.

El colesterol es transportado en la sangre por apolipoproteínas y su nivel es regulado por su concentración intracelular y por hormonas como el glucagón que promueve la fosforilación de la HMG-CoA reductasa inactivándola, y la insulina que promueve la desfosforilación de la enzima activándola.

Este esteroide no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que en el cerebro es sintetizado *de novo* por los astrocitos, ya que las neuronas no son eficientes en su producción. Los astrocitos responden ante la demanda de colesterol de las neuronas a través de secretar complejos de ApoE-colesterol, que son transportados hacia la neurona para su desarrollo y función. Estudios en modelos murinos han mostrado que los astrocitos y la microglía son las principales células secretoras de ApoE, mientras que las neuronas la expresan bajo condiciones de excitotoxicidad (Xu et al., 2006). La ApoE es la principal proteína transportadora de colesterol en el cerebro y a través de su receptor regula la redistribución y homeostasis del colesterol. El humano expresa tres alelos del gen: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ (Xu et al., 2006) y su transcripción es regulada por el producto de oxidación del colesterol, el 24-hidroxicolesterol (24-OH), que es liberado por la neurona vía el receptor X del hígado (LXR) (Pfrieger, 2003; Nieweg et al., 2009). El LXR es un receptor nuclear que regula la expresión de genes específicos involucrados en el flujo y metabolismo del colesterol, como el transportador de unión al casete de ATP A1 y G1 (ABCA1 y ABCG1), y ApoE (Sodhi and Singh, 2013). En las neuronas, el colesterol es convertido, mediante la 24-hidroxilasa (CYP46A1), en 24-OH que puede difundir a través de la barrera hematoencefálica hacia la circulación sistémica. En menor medida, el colesterol también es convertido a 27-hidroxicolesterol (27-OH) mediante la 27-hidroxilasa (CYP27A1) y después a ácido 7 α -hidroxi-3-oxo-4 colestenoico (7-OH-4-C) por la enzima CYP7B. Una vez que el 7-OH-4-C cruza la barrera hematoencefálica, alcanza el hígado donde es eliminado (Björkhem, 2006; Meaney et al., 2007; Björkhem et al., 2009).

En cuanto a su papel en la membrana celular, la presencia de colesterol disminuye la movilidad por rotación de la unión carbono-carbono de las cadenas lipídicas, forzándolas a estar en su conformación extendida. Los grupos acilo de las cadenas saturadas pueden formar asociaciones más compactas y estables con el sistema de anillos del colesterol. El colesterol se asocia preferentemente con la esfingomielina, más que con la fosfatidilcolina,

y favorece la formación de balsas lipídicas, las cuales han sido estudiadas bioquímicamente a través de la obtención de membranas resistentes a detergentes (DRMs) por medio de detergentes no iónicos como el Tritón X-100 y el Lubrol WX a 4°C (Brown and London, 1998). Han sido implicadas en la señalización neuronal, adhesión y guía axonal (Paratcha and Ib Oez, 2002; Golub et al., 2004; Kamiguchi, 2006) y se ha propuesto que funcionan como centros de señalización incluyendo y excluyendo ciertas proteínas en una extensión variable. Es así, que se ha demostrado que una proteína puede tener diferentes funciones dentro y fuera de las balsas lipídicas acoplándose a diferentes efectores y mecanismos de señalización (Simons and Toomre, 2000; Helms and Zurzolo, 2004).

- *Colesterol, balsas lipídicas y vía amiloidogénica*

El cerebro es el órgano más rico en colesterol, aproximadamente el 25% del total del colesterol es contenido en el cerebro (Dietschy and Turley, 2001; Dietschy and Turley 2004). Se conoce que dietas altas en grasa (que incluyen colesterol) juegan un papel importante en promover el estrés oxidante en el cerebro e inducen cambios en el metabolismo energético y en las funciones cerebrales, que favorecen el desarrollo de alteraciones cognitivas incluyendo la demencia y la neurodegeneración (Morrison et al., 2010; Uranga et al., 2010).

El cerebro de pacientes con Alzheimer se caracteriza por un contenido alto en ácidos grasos de cadena larga (Roher et al., 2002) y se ha observado que el palmitato, que es un ácido graso saturado, induce cambios parecidos a los que suceden en el Alzheimer en cultivos neuronales primarios de rata. Estos efectos son mediados por las ceramidas producidas a través de la palmitoiltransferasa de serina (SPT) que se encuentra en astrocitos primarios de rata (Patil and Chan, 2005; Patil et al., 2007) y que se ha observado incrementada en el cerebro de pacientes con Alzheimer. La supresión de la SPT disminuye la expresión de A β , mientras que su sobreexpresión incrementa la A β de astrocitos primarios que expresan la APP humana con la mutación sueca (Geekiyange and Chan, 2011). Además, se sabe que las ceramidas incrementan la producción de A β a través de la estabilización postraduccional de BACE-1 (Puglielli et al. 2003). Se ha postulado que el A β y

las ceramidas se encuentran en balance bajo condiciones fisiológicas, y que dicho balance puede ser interrumpido bajo condiciones patológicas como en la EA, favoreciendo así la formación de un asa de retroalimentación positiva. Por otro lado, la elevación de esfingomielinasas (SMases) en cerebros de pacientes con EA, resulta en niveles bajos de esfingomielina lo que promueve el procesamiento de APP por γ -secretasa, además de la activación de BACE-1 dependiente de ceramidas (Grimm et al., 2012).

Aunque sigue siendo controversial el papel del colesterol en la EA, su importancia en la patogénesis es evidente según lo reportado en los siguientes estudios: 1) los niveles totales de colesterol y LDL en el suero correlacionan con la cantidad de A β en cerebros de pacientes con EA (Kuo et al., 1998), 2) evidencia epidemiológica sugiere que los individuos con niveles elevados de colesterol durante la mediana edad tienden a desarrollar la patología de Alzheimer (Kivipelto et al., 2001), 3) en estudios retrospectivos se ha observado que algunos pacientes tratados con estatinas, inhibidores de la hidroximetil glutaril- coenzima A (HMG) reductasa, para bajar los niveles de colesterol, muestran una reducción significativa en la prevalencia e incidencia de EA (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). En apoyo a estos trabajos, se ha observado que dietas altas en colesterol incrementan la formación de placas amiloideas en conejos y A β en corteza cerebral de ratas (Sparks et al., 1994; Mendoza-Oliva et al., 2015), mientras que en cerdos de guinea, así como en ratones que son modelos transgénicos de EA, el tratamiento con drogas que reducen el colesterol, disminuyen marcadamente los depósitos de A β , demostrando una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de colesterol y la cantidad de A β cerebral (Fassbender et al., 2001; Refolo et al., 2001). Estudios en cultivos celulares y experimentos en animales, han demostrado que la alteración en la distribución subcelular del colesterol puede modular el procesamiento de la APP. Además, tanto el A β secretado como el intracelular está disminuido en neuronas cuando el transporte de colesterol de los organelos endocíticos tardíos al retículo endoplásmico es bloqueado (Runz et al., 2002). Aunado a lo anterior, se ha encontrado una asociación positiva entre polimorfismos de ApoE y la enfermedad de Alzheimer, y se ha observado que en cerebros de pacientes se expresan ampliamente los receptores a esta apolipoproteína. Se conoce que los individuos homócigos para el alelo ApoE ϵ 4 tienen entre el 50-90% más probabilidad de desarrollar la

enfermedad entre los 60 y 70 años de edad, en comparación con aquellos que poseen el alelo $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ (Puglielli et al., 2003; Evans et al., 2004; Bu, 2009; Kim et al., 2009; Martins et al., 2009; Schipper, 2011). Además, se ha observado que el genotipo ApoE $\epsilon 4$, más que el ApoE $\epsilon 3$, aumenta la producción de A β y la formación de fibrillas tanto *in vitro* como en ratones transgénicos y que ApoE $\epsilon 4$ sinergiza la toxicidad de A β (Holtzman et al., 2000; Carter et al., 2001; Ji et al., 2002; Ye et al., 2005).

Mediante el uso del ratón transgénico EFAD-Tg, el cual expresa la ApoE humana y sobreexpresa el A β a la edad de dos meses vía cinco mutaciones características de la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD), se ha encontrado que entre los 2 a 6 meses de edad la formación de placas amiloides compactas es mayor en los ratones E4FAD (expresan la ApoE $\epsilon 4$), mientras que los ratones E2FAD y E3FAD presentan placas difusas a la misma edad (Youmans et al., 2012). Por otro lado, en cerebros de pacientes con EA la ApoE colocaliza con el colesterol y la A β fibrilar en las placas seniles (Burns et al., 2003).

También se ha observado que el colesterol puede ser oxidado generando productos como los oxiesteroles, que han sido implicados en la enfermedad de Alzheimer (Dias et al., 2014). En líquido cefaloraquídeo y circulación periférica de pacientes con EA en etapas tempranas, se han encontrado niveles altos de 24-OH comparados con sujetos normales, sugiriendo un incremento en la conversión de colesterol en el cerebro durante los cambios neurodegenerativos propios de la enfermedad (Lütjohann et al., 2000; Papassotiropoulos et al., 2002; Kölsch et al., 2004). De manera contraria, los niveles plasmáticos del 24-OH en pacientes con EA en etapas tardías se encuentran disminuídos, sugiriendo que la tasa de transporte del colesterol baja conforme la enfermedad avanza (Bretillon et al., 2000; Kölsch et al., 2004). Más aún, en cerebros de pacientes con EA y en ratones viejos que expresan la mutación sueca de APP, se ha encontrado una disminución en los niveles de 24-OH y un aumento en el 27-OH (Heverin et al., 2004). De esta manera, la conversión de colesterol a 24-OH ha sido considerada como protectora para el cerebro, ya que regula la homeostasis del colesterol, favorece su flujo fuera del cerebro y previene la generación de A β (Björkhem et al., 2009). Por otro lado, estudios en células de neuroblastoma han detectado que el 24-OH favorece la vía no amiloidogénica, mientras que el 27-OH estimula la vía amiloidogénica promoviendo la producción de A β así como la hiperfosforilación de

tau (Bu, 2009; Prasanthi et al., 2009; Marwarha et al., 2010). Se ha observado en estudios *in vitro* que el 24-OH reduce la producción del A β a través de regular a la baja el tráfico de la APP (Urano et al., 2013). Experimentos con células SH-SY5Y incubadas con 27-OH demuestran su efecto en el aumento de los niveles de A β 42, APP y BACE-1. Por el contrario, el tratamiento con 24-OH incrementa los niveles de sAPP α favoreciendo la vía no amiloidogénica (Prasanthi et al., 2009). La toxicidad del 27-OH ha sido demostrada también en astrocitos C6 y se ha observado que incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuye los sistemas de defensa antioxidante afectando la viabilidad celular (Gamba et al., 2011). Además del 24-OH y el 27-OH, se han identificado otros oxisteroles que están implicados en EA con el 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OH) que se ha propuesto interacciona con APP y A β (Nelson and Alkon, 2005). En cerebros de pacientes con EA se han identificado también a los oxisteroles: 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OH), 4 β -hidroxicolesterol (4 β -OH), 5 α , 6 α - y 5 β , 6 β -epoxicolesterol (α - y β -EPOX) y 7-cetocolesterol (7-K) (Hascalovici et al., 2009). En hipocampos de ratas donde hay presencia de gliosis e inflamación, después de un daño excitotóxico, se han detectado incrementos en los niveles de 24-OH, 7-K y β -EPOX (He et al., 2006; Kim et al., 2010). Se ha sugerido también que el 7 β -OH fomenta el rearrreglo de la membrana favoreciendo la formación de balsas lipídicas (Wang et al., 2008; Mitomo et al., 2009).

Más aún, se ha propuesto que tanto el fragmento C-99 como la APP tienen la capacidad de unir colesterol específicamente, sugiriendo al colesterol como un factor importante en el tráfico de la APP hacia las balsas lipídicas y posiblemente modulando el corte por la β - y/o γ -secretasa. La observación de que C-99 tiene la propiedad de unir colesterol, ha hecho pensar que una de las funciones de APP es la de un sensor/receptor de colesterol que regula la toma de colesterol bajo ciertas condiciones de composición de la membrana lipídica (Beel et al., 2008). A través de diferentes técnicas, como la resonancia magnética nuclear, la espectroscopía de resonancia paramagnética de electrones y la trititación se ha demostrado que en el dominio TMD del fragmento C-99 se encuentra el sitio de unión de colesterol y se ha propuesto que para esta unión son necesarias las glicinas G₇₀₀ y G₇₀₄ localizadas en tándem en motivos GXXXG (Barrett et al., 2012; Song et al., 2013) que se sabe median las interacciones hélice-hélice del TMD con la

membrana (Brosig and Langosch, 1998; Russ and Engelman, 2000; Senes et al., 2004). En un sistema de células neuronales, las mutaciones en los residuos de glicina G₂₉ y G₃₃ del motivo GXXXG atenúan gradualmente la dimerización del TDM, reduciendo específicamente la formación de A β 42 y no afectando los niveles de A β 40. Sin embargo, se ven aumentados los niveles de A β 38 y otras especies cortas de A β (Munter et al., 2007).

Por otro lado, varios grupos de investigación han evidenciado la implicación de las balsas lipídicas, y por ende al colesterol, en el procesamiento amiloidogénico de la APP. Se ha encontrado que el colesterol tiene efecto en la glicosilación de la APP tanto en neuronas como en astrocitos, de manera tal que una gran cantidad de APP inmadura alcanza la membrana pero no está disponible para ser cortada por la α -secretasa y decae la producción del fragmento soluble sAPP α (Galbete et al., 2000). Más aun, se ha observado que tanto β como γ -secretasa se encuentran en microdominios membranales insolubles en detergentes no iónicos y con alto contenido de colesterol y esfingolípidos, lo cual sugiere la presencia de estas enzimas en balsas lipídicas (Koo et al., 1994; Riddell et al., 2001; Wahrle et al., 2002; Eehalt et al., 2003; Golub et al., 2004; Kawarabayashi et al., 2004; Lucero et al., 2004; Vetrivel et al., 2004). A pesar de que pequeñas porciones de APP se encuentran asociadas con las balsas lipídicas, la mayor generación de A β ocurre en ellas. Un estudio reciente propone que el incremento local de colesterol promueve la agregación de APP y BACE-1 en balsas lipídicas y una rápida endocitosis. Usando las técnicas de FLIM-FRET y TIRF se demostró que la exposición de menos de 10 min al colesterol incrementa selectivamente la proximidad de APP y BACE-1 en la membrana y relocaliza a APP en las balsas lipídicas, mientras que con la exposición prolongada al colesterol se encuentra a BACE-1 y APP en proximidad pero de manera intracelular. Este trabajo demuestra que el colesterol no incrementa la producción de A β teniendo un impacto directo en la actividad catalítica de BACE-1 sino que altera la accesibilidad de BACE-1 a su sustrato, APP. Estos cambios en la accesibilidad son mediados por su agregación en balsas lipídicas seguida de una rápida endocitosis (Marquer et al., 2011).

En cuanto a los esfingolípidos, los cuales son componentes de las balsas lipídicas, se ha observado que GM1 está incrementado en pacientes con EA (Svennerholm and Gottfries, 1994). Se ha encontrado que tanto GM1 como GM2 se localizan en balsas

lipídicas en la corteza temporal y frontal de cerebros con EA (Molander-Melin et al. 2005) y en células SH-SY5Y, el tratamiento con GM1 estimula la producción de A β por la γ -secretasa y disminuye a la α -secretasa promoviendo el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica (Zha et al., 2004). De manera contraria, la inhibición farmacológica de la síntesis de gangliósidos, mediante la inhibición de la enzima glucosilceramida, resulta en la reducción de A β y sAPP β , y el incremento de sAPP α (Tamboli et al., 2005). También se ha observado que el GM1 posee una gran afinidad por A β (Ariga et al. 2001), promoviendo cambios conformacionales que conducen a la formación de fibrillas (Choo-Smith et al., 1997; Okada et al. 2007). Asimismo, se ha detectado que el GM1 se une a A β en las placas amiloides (Hayashi et al., 2004) sugiriendo su incidencia en la formación de los agregados de A β .

1.2.3.2 Estrés Oxidante

- *Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)*

Los radicales libres pueden ser definidos como átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales electrónicos que le dan su capacidad reactiva. Los radicales libres que provienen del oxígeno forman parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y son ubicuas, altamente reactivas, de tiempo de vida media muy corto, se producen en el metabolismo del oxígeno en los sistemas biológicos aeróbicos y reaccionan con las moléculas que se encuentran a su alrededor empezando con aquellas que se encuentran muy cercanas a su sitio de formación. Las ROS incluyen al radical superóxido (O₂•), al radical hidroxilo (OH•) y al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Fig.14), además de las especies reactivas de nitrógeno (RNS), que son consideradas ROS debido a que poseen tanto átomos de oxígeno como de nitrógeno. Las RNS incluyen al óxido nítrico (NO) y al radical peroxinitrito (ONOO•). Tanto las ROS como las RNS son necesarias a bajas concentraciones para modular diversos procesos fisiológicos como la señalización intracelular, la diferenciación, el control del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta del sistema inmune y la defensa contra los microorganismos. Los niveles altos de estas especies reactivas pueden producir daños a las células. Sin embargo, existen sistemas antioxidantes de defensa que están compuestos por enzimas antioxidantes entre

las que se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) (Fig. 14) y otros no enzimáticos como el ácido ascórbico (vitamina C), el α -Tocoferol (vitamina E), el glutatión reducido (GSH), los carotenoides y los flavonoides (Moreira et al., 2005; Li et al., 2013).

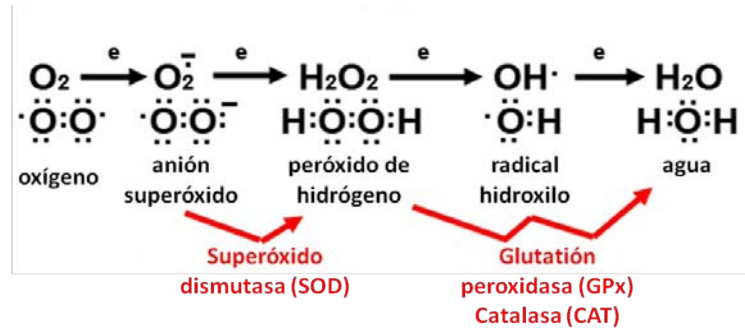


Figura 14. ROS y antioxidantes. Formación de ROS a partir del oxígeno y enzimas antioxidantes que participan en cada paso.

Cuando existe una pérdida del balance entre las ROS y los sistemas antioxidantes, se presenta el estrés oxidante que está dado por un aumento en la producción de ROS y/o la disminución de las enzimas antioxidantes. La formación de ROS puede ser incrementada por diferentes factores como la radiación electromagnética UV, la exposición a herbicidas, temperaturas extremas, cierto tipo de toxinas, contaminantes ambientales, metales, xenobióticos y diversas moléculas que median eventos de inflamación.

Las fuentes de ROS tanto extracelulares como intracelulares pueden modular la expresión de genes. Por ejemplo, la acción directa de la señalización por H_2O_2 en la regulación diferencial de genes antioxidantes es debida a las interacciones proteína-DNA en la región del elemento de respuesta antioxidante (ARE; TGACTCA), NF- κ B y el elemento de respuesta al ácido abscísico (ACGT) en los promotores de los genes. Se sabe que al incrementarse la producción de H_2O_2 se puede activar a la proteína NF- κ B, mediante la forma activa de la proteína Rho que es una GTPasa que responde a la modificación del estado redox celular. Además, se ha observado que dosis bajas de H_2O_2 inducen cambios en la fosforilación de proteínas reguladoras de vías de señalización como la proteína cinasa B o Akt.

El estrés oxidante es uno de los eventos principales asociado con el daño celular y está estrechamente relacionado con el envejecimiento y la progresión de algunas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer.

- *Estrés oxidante y vía amiloidogénica*

Se sabe que el cerebro es vulnerable al estrés oxidante debido al alto consumo de oxígeno que requiere (utiliza alrededor del 25% del oxígeno respirado) y a los niveles altos de ácidos grasos polinsaturados, además de que es un órgano en donde las enzimas antioxidantes se encuentran en menor medida comparadas con otros órganos del cuerpo (Ansari and Scheff, 2010; Mazzetti et al., 2015). Las neuronas son las células más vulnerables a la sobreproducción de ROS y RNS, y su sobrevivencia depende de la acción antioxidante de los astrocitos a través de la liberación de glutatión (Shih et al., 2003).

Se conoce que el estrés oxidante incrementa con la edad a través de variaciones en la generación de ROS, su eliminación o ambos (Barja, 2004; Abd El Mohsen et al., 2005; Rodrigues Siqueira et al., 2005; Reynolds et al., 2007; Smith et al., 2010). La hipótesis de los radicales libres plantea que el envejecimiento implica la acumulación de ROS resultando en el daño a los componentes de la célula como el núcleo, el DNA mitocondrial, las membranas y las proteínas citoplasmáticas (Harman, 1992).

En cuanto a las membranas lipídicas, el estrés oxidante promueve la peroxidación de los lípidos. Esta modificación oxidativa de ácidos grasos induce el daño estructural de las membranas y la generación de varios productos finales aldehídicos que tienen *per se* un potencial oxidante que lleva a la alteración de funciones celulares. La lipoperoxidación es frecuentemente usada como marcador oxidativo y se ha observado se encuentra incrementada durante el envejecimiento (Keller and Mattson, 1998; Zhu et al., 2006).

Se cree que el incremento en el estrés oxidante es un evento temprano en la patología de EA (Nunomura et al., 2001; Cutler et al., 2004; Mariani et al., 2005; Zhu et al., 2005; Reynolds et al., 2007; Smith et al., 2010) y puede contribuir al daño de la membrana celular, a alteraciones en el citoesqueleto y a la muerte celular (Perry et al., 2000). De hecho, se ha propuesto que el estrés oxidante juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Markesbery, 1997; Floyd, 1999; Moreira et al., 2005; Guglielmotto et

al., 2010; Li et al., 2013), ya que se han encontrado incrementados marcadores de estrés oxidante en cerebros de pacientes con EA (Nunomura et al., 2004; Mielke and Lyketsos, 2006; Sultana et al., 2008) y en modelos transgénicos de Alzheimer (Sultana et al., 2008; Matsumura et al., 2015).

En cuanto a la vía amiloidogénica, se ha observado que agentes oxidantes y productos oxidativos incrementan la expresión de APP (Cheng and Trombetta, 2004; Patil et al., 2006) y los niveles de A β intracelular y secretado en células neuronales y no neuronales como los astrocitos (Misonou et al., 2000; Atwood et al., 2003; Murray et al., 2007). A su vez, el aumento de APP y A β ha sido asociado con efectos perjudiciales en la función y homeostasis de la mitocondria (Manczak et al., 2006). La APP afecta el metabolismo energético de la mitocondria llevando a la producción de ROS (Anandatheerthavarada et al., 2003) y el A β puede entrar a la mitocondria induciendo la generación de radicales libres, la interrupción de la cadena de transporte de electrones, el aumento en la permeabilidad de la mitocondria, la disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa y finalmente la disfunción mitocondrial (Mungarro-Menchaca et al., 2002; Du et al., 2010).

Por otro lado, se sabe que las ROS activan a las enzimas de la vía amiloidogénica, acelerando la producción de A β (Tamagno et al., 2008; Guglielmotto et al., 2010;). La expresión y actividad de BACE-1 se ha visto incrementada con el uso de oxidantes *in vitro* (Tamagno et al., 2002, 2003, 2005; Kao et al., 2004; Tong et al., 2005) y se ha correlacionado su actividad con marcadores oxidantes en tejido de cerebros de pacientes con EA esporádico (Borghi et al., 2007), en los cuales también se ha demostrado el aumento de la expresión de BACE-1 (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Yang et al., 2003). Además, existe una correlación entre la inducción de estrés oxidante con el incremento del corte de APP por γ -secretasa (Minopoli et al., 2007) y la producción de A β (Paola et al., 2000; Tamagno et al., 2002; Tong et al., 2005). De esta manera, el incremento de la producción de ROS se ha propuesto actúa como un mediador de la pérdida sináptica promoviendo la formación de placas seniles (Zhu et al., 2004; Kern and Behl, 2009). Sin embargo, aún no es claro si el estrés oxidante es causa o consecuencia de la neuropatología asociada con EA (Zhu et al., 2007; Bonda et al., 2010; Smith et al., 2010; Luque-Contreras et al., 2014).

1.3 Los astrocitos y la enfermedad de Alzheimer

La patología celular que presentan los astrocitos en el cerebro envejecido así como su papel modulando diversas respuestas del cerebro en las enfermedades neurodegenerativas son aspectos que recientemente han comenzado a estudiarse. En años recientes se ha propuesto que la desregulación de muchas de las funciones fisiológicas normales del astrocito en el cerebro, está implicada en el desarrollo de la EA. Algunas de estas alteraciones se han asociado con cambios en la cerebrovasculatura, la capacidad fagocítica, la respuesta inflamatoria, la señalización por calcio, la captura de neurotransmisores y el metabolismo de la APP por el propio astrocito (revisado en Avila-Muñoz and Arias, 2014).

Los astrocitos son un componente esencial de la barrera hematoencefálica, controlando el flujo sanguíneo y la permeabilidad de la misma. Durante la EA, se ha observado que el depósito de la proteína amiloide en la microvasculatura cerebral obstuye el flujo sanguíneo capilar, induce la acumulación de compuestos tóxicos y cambios en la composición metabólica que finalmente llevan a la disfunción sináptica y neuronal. Estos cambios han sido asociados con la alteración en las funciones de los astrocitos principalmente a través de la modificación de la señalización por calcio.

Otra función importante es la captura y eliminación de A β a través de las enzimas neprilisina (NEP), la enzima degradadora de la insulina (INE) y la metaloproteasa de matriz-9 (MMP-9). Recientemente se ha reportado que la NEP se encuentra reducida en astrocitos provenientes de pacientes con EA y se ha sugerido que la capacidad de degradar al péptido amiloide se encuentra disminuida durante la enfermedad, más que la capacidad de captura del A β oligomérico que se sabe es la forma preferente por los astrocitos (revisado en Avila-Muñoz and Arias, 2014).

Uno de los procesos alterados en los astrocitos durante la EA es la comunicación por calcio. Los astrocitos se comunican entre ellos y con las neuronas a través de incrementos en la concentración de calcio intracelular, estos incrementos pueden regular la actividad y sobrevivencia neuronal, y la expresión de genes en ambas células. Se sabe que los astrocitos expuestos a A β exhiben transientes de calcio que resultan en el aumento

de GFAP y S100 β , la depleción de la glutatión en neuronas, la producción de ROS por los astrocitos y la muerte neuronal (revisado en Avila-Muñoz and Arias, 2014).

Como se mencionó, los astrocitos también juegan un papel importante en la captura de neurotransmisores como el glutamato, el cual es el neurotransmisor excitador más importante y está involucrado en la transmisión y plasticidad sináptica, el crecimiento y diferenciación neuronal, y el aprendizaje y la memoria. Se sabe que los astrocitos mantienen los niveles de glutamato por debajo de concentraciones tóxicas a través de transportadores, ya que un aumento desregulado de este neurotransmisor puede llevar a la muerte neuronal por excitotoxicidad. Se ha observado que cuando crecen neuronas corticales sin la presencia de astrocitos, la vulnerabilidad de las neuronas al glutamato aumenta cien veces. Más aún, se ha encontrado que los astrocitos derivados de pacientes con EA y de modelos transgénicos de la enfermedad poseen una capacidad disminuida en la captura de glutamato. Uno de los transportadores de glutamato involucrado es el GLT1/EAAT2, que en la EA presenta una reducción en su actividad y una correlación inversa con la presencia de GFAP y la expresión del mRNA de APP (revisado en Avila-Muñoz and Arias, 2014).

Una de las hipótesis neuroquímicas para explicar los déficits cognitivos durante la EA es la hipótesis del déficit colinérgico. Los receptores de acetilcolina neuronales (nAChRs) son miembros de una superfamilia de canales iónicos dependientes de ligando que están involucrados en funciones fisiológicas como el aprendizaje y la memoria. En cuanto a los astrocitos, se ha observado que en cerebros de pacientes con EA esporádico y familiar existe un aumento en la proporción de células que expresan $\alpha 7$ nAChR y la consiguiente alteración de la homeostasis de calcio y la producción de óxido nítrico.

Los astrocitos también están implicados de manera muy importante en la regulación de la respuesta inflamatoria ante un daño. Se sabe que la inflamación crónica contribuye a la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y que el uso de agentes anti-inflamatorios, como las drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs), tienen un efecto benéfico tanto en pacientes con EA como en modelos transgénicos. Se ha propuesto que el mecanismo de estas drogas es a través de la modulación de la actividad de la γ -secretasa o a través de interferir con la conformación de

A β , evitando su agregación. Algunos de los mediadores inflamatorios, que se ha propuesto son liberados por los astrocitos y la microglía durante la EA son las citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α y TGF- β . Se han observado niveles incrementados de IL-1 β e IL-6 en tejido de cerebro de pacientes con EA, y su presencia en suero y en líquido cefaloraquídeo incluso antes de la aparición o aumento de A β y tau hiperfosforilada. Los niveles de IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-13 en plasma se han correlacionado inversamente con el volumen total del cerebro, el volumen ventricular y el volumen de la corteza entorrinal en EA (revisado en Avila-Muñoz and Arias, 2014).

La activación de los astrocitos ha sido atribuida a la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Sidoryk-Wegizynowicz et al., 2011). Se sabe que en muestras provenientes de humanos, un incremento en la gliosis reactiva parece preceder el desarrollo de las lesiones características de la EA (Wharton et al., 2009). En esta enfermedad, la astrogliosis tiende a ser focal de manera tal, que los astrocitos se encuentran cercanos a las placas amiloideas o a los depósitos difusos rodeándolos con capas densas de procesos formando pequeñas cicatrices (Thal et al., 2000; Nagele et al., 2004). Estudios recientes indican que el procesamiento de la APP, aparentemente no solo ocurre en neuronas sino que los astrocitos pueden ser una fuente celular de A β ya que expresan tanto a la proteína APP, como a BACE-1 y a la γ -secretasa que son necesarias para que se lleve a cabo el corte proteolítico de la APP en la vía amiloidogénica. Se sabe que los astrocitos activos que rodean a las placas amiloideas, tanto en pacientes con EA como en modelos transgénicos de la enfermedad, expresan BACE-1 y se ha encontrado que estas células son capaces de aumentar los niveles de A β . (Busciglio et al., 1993; Diehlmann et al., 1999; Miake et al., 1999; Young et al., 1999; RoBner et al., 2001; Burton et al., 2002; Uryu et al., 2002; Hartlage-Rubsamen et al., 2003; RoBner et al., 2005; Nadler et al., 2008; Dal Prà et al., 2011). Más aún, se ha demostrado que los astrocitos activados por diferentes combinaciones de citocinas proinflamatorias muestran un aumento de BACE-1 y de la producción de A β . En células de astrocitoma U373, la inducción de BACE-1 por IFN- γ depende de la vía de señalización de JAK2 y ERK1/2, que promueven la fosforilación de STAT1 que se une a la región promotora de BACE-1 modulando su expresión. Sin embargo,

existen trabajos en donde el tratamiento con citocinas no aumenta BACE-1 y proponen que la actividad de β -secretasa está dada por la proteína homóloga BACE-2. Más aún, se ha reportado que la IL-1 β incrementa la expresión de APP y exacerba la fosforilación de tau a través de la vía de señalización de p38 MAPK. En cultivos primarios de astrocitos y en líneas celulares de astrocitoma se ha observado que la estimulación con las combinaciones de IFN- γ y TNF- α o IFN- γ e IL-1 β aumenta de manera significativa la producción de A β 40 y A β 42 (revisado en Avila-Muñoz and Arias, 2014). Por otro lado, los ácidos grasos saturados como el ácido palmítico promueve la liberación de TNF- α e IL-6 por los astrocitos. Se ha observado que la inhibición de las vías de p38 o MAPK previene sus efectos pro-inflamatorios, mientras que la inhibición de JNK y PI3K no afecta la liberación de citocinas inducida por el ácido graso (Gupta et al., 2012). Cuando se utiliza medio condicionado proveniente de astrocitos tratados con palmitato, se ha determinado que se incrementan significativamente los niveles de BACE-1 y de A β en neuronas primarias corticales de rata. La síntesis de novo de ceramidas producidas por astrocitos, después del tratamiento con palmitato, media estos incrementos a través de la liberación de TNF- α e IL-1 β (Patil and Chan, 2005; Patil et al., 2006, 2007; Liu et al., 2013) y se ha propuesto que las ceramidas estabilizan traduccionalmente a BACE-1 para promover la biogénesis de A β en células de neuroglioma de humano (Puglielli et al., 2003; Ko and Puglielli, 2009).

En cuanto al colesterol, se ha propuesto que al igual que en las neuronas, tiene efecto en la producción de A β en astrocitos. En astrocitos HTB-15 se demostró que la exposición al colesterol inhibe a sAPP α y reduce la viabilidad celular, mientras que el uso de lovastatina, que es una estatina que inhibe la síntesis de colesterol, aumenta el procesamiento de APP por α -secretasa favoreciendo la vía no amiloidogénica (Xiu et al., 2006). Más aún, se ha observado que en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC), que muestra similitudes con la enfermedad de Alzheimer en los niveles elevados de A β , existen astrocitos reactivos que expresan altos niveles de APP, BACE-1 y γ -secretasa. Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación intracelular de colesterol y glucoesfingolípidos en muchos tejidos incluyendo el cerebro (Kodam et al., 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que los oligómeros de A β 40 y A β 42 inducen modificaciones en la señalización por calcio en astrocitos, y que esto depende del alto

contenido de colesterol en la membrana. La señalización por calcio inducida en los astrocitos por el A β estimula a la NADPH oxidasa, lo cual promueve la producción de ROS y la modulación de los niveles de GSH (Angelova and Abramov, 2014). El A β al unirse con cobre actúa parecido a una metaloenzima y es capaz de promover un estado de estrés oxidante produciendo directamente H₂O₂ del colesterol que funciona como un agente reductor (Opazo et al., 2002). Además, el A β induce a través de su actividad oxidante sobre el colesterol, la producción de 7 β -hidroxicolesterol que es un oxiesterol sumamente tóxico (Nelson and Alkon, 2005; Vaya and Schipper, 2007). El estrés oxidante ha sido asociado con eventos de neuroinflamación y se ha encontrado que existe un círculo vicioso que conecta al estrés oxidante con la inflamación en la enfermedad de Alzheimer (Rosales-Corral et al., 2010; Quintanilla et al., 2012; Joshi and Praticò, 2015). Se ha observado que durante la neurodegeneración, el estado redox modula a moléculas inflamatorias que están involucradas en procesos de señalización y que a su vez son mediadores críticos del estrés oxidante y la inflamación (Mrak and Griffin, 2005; Kierdorf et al., 2010). En cuanto a los astrocitos, el estrés oxidante induce su activación y el aumento en la producción de citocinas que sucesivamente llevan a la liberación de más ROS que finalmente exacerban el daño neuronal y pueden afectar el procesamiento amiloidogénico (Block et al., 2007).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los factores importantes en el desarrollo de la EA es la sobreproducción de A β . Diversos estudios han encontrado una correlación entre el aumento de los niveles de

colesterol y el incremento en el procesamiento de la APP en balsas lipídicas en neuronas, y una asociación entre las placas amiloideas y la presencia de astrocitos reactivos. Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado el papel de los astrocitos en el procesamiento amiloidogénico de la APP ni si este procesamiento es modificado por el contenido de colesterol similar a lo que ocurre en neuronas.

3. HIPÓTESIS

El incremento en los niveles de colesterol favorecerá el procesamiento amiloidogénico de la APP, a través de promover su asociación con BACE-1 en astrocitos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar el papel del colesterol en el contenido y procesamiento de la APP y su localización en balsas lipídicas en astrocitos primarios.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer la presencia de los elementos de la vía amiloidogénica (APP y BACE-1) en cultivos primarios de astrocitos.
- Analizar el efecto del colesterol en el contenido y procesamiento de la APP, analizando los fragmentos proteolíticos generados a través de la vía no amiloidogénica (sAPP α y C-83) y de la amiloidogénica (sAPP β , C-99, A β 1-42 y A β 1-40).
- Evaluar el efecto del colesterol en la asociación entre APP y BACE-1.
- Evaluar la asociación de APP con BACE-1 y si es modificada por el contenido de colesterol.
- Determinar un posible mecanismo por el cual el colesterol promueva el metabolismo amiloidogénico en astrocitos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales y reactivos

Basal Eagle's médium (SIGMA-Aldrich), glutamina (Gibco), penicilina-estreptomicina (Gibco), suero fetal bovino (Byproducts), malla de nylon de 60µm de poro (Millipore), DNAsa I (Invitrogen), inhibidor de tripsina (Gibco), colesterol (SIGMA-Aldrich), lovastatina (Calbiochem), Euk-134 (SIGMA- Aldrich), filipina III (SIGMA-Aldrich), Bio-Rad DC™ protein assay kit (Bio-Rad), A-agarosa (Millipore), anticuerpo contra GFAP (Dako), anticuerpo contra NeuN (Millipore), anticuerpo contra APP 22C11 (Millipore), anticuerpo contra APP A4 (I-17) (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo contra APP (EPR5118) (abcam), anticuerpo contra BACE-1 (Cell Signaling), anticuerpo contra β-actina (SIGMA-Aldrich), anticuerpo *goat anti-mouse* (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo *goat anti-rabbit* (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo *chicken anti-goat* (Chemicon), anticuerpo *goat anti-rabbit* Alexa 546 (Invitrogen), anticuerpo *donkey anti-mouse* Alexa 488 (Invitrogen), anticuerpo *goat anti-rabbit* Alexa 488 (Invitrogen), fluorescent mounting médium (Dako), membranas de nitrocelulosa Amersham™ Hybond™-ECL (GE Healthcare), kit de quimioluminiscencia Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), placas para revelar BioMax Light Films (Kodak), kit de ELISA para Aβ42 (Invitrogen), kit de ELISA para Aβ40 (Invitrogen), dihidroetidio (SIGMA-Aldrich), dihidrorhodamina 123 (SIGMA-Aldrich), subunidad β de la toxina del cólera (CTB) (Invitrogen), microscopio confocal Zeiss LSM5 (Carl Zeiss), microscopio DSU BX51 WI (Olympus), microscopio invertido IX71 (Olympus), software de análisis de imágenes ImageJ versión 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, software de estadística GraphPad Prism versión 4.00 (GraphPad Software, Inc)

5.2 Cultivo primario de astrocitos

El cultivo primario de astrocitos fue obtenido de ratas Wistar de dos días de nacidas (Morán and Patel, 1989). Las ratas fueron sacrificadas a los dos días de nacidas y se obtuvieron los cerebros, a los cuales se les realizó disección fina para la obtención de la corteza cerebral. Las cortezas se colocaron en una caja Petri con 10 ml de *Solución 1*: 45 ml de solución Krebs (120.3 mM NaCl, 4.82 mM KCl, 1.21 mM KH₂PO₄, 25.47 mM NaHCO₃, 14.3 mM glucosa, 0.015 gr rojo fenol), 400 µl de MgSO₄ al 3.8%, 5 ml de H₂O bidestilada y 150 mg de BSA (albúmina de suero bovino). Una vez obtenidas las cortezas, se limpiaron quitando con cuidado las meninges y vasos sanguíneos, y en una caja Petri de 35 mm

fueron trituradas con un bisturí. Posteriormente, se depositó el tejido en un tubo con 10 ml de la *Solución 1* y se centrifugó a 1000 rpm por un minuto, eliminando el sobrenadante. Se filtraron 6ml de *Solución 2*: 6.25 ml de *Solución 1* más 1.6 mg de tripsina (Sigma-Aldrich); y se dejó incubando el tejido a 37°C por 8 min. Después de la incubación, se filtraron 6 ml de *Solución 4*: 5.6 ml de *Solución 1* más 1 ml de *Solución 3*; y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm por un minuto, eliminando posteriormente el sobrenadante. Una vez eliminado el sobrenadante, se filtraron 2 ml de *Solución 3*: 4.9 ml de *Solución 1*, 0.8 µl de DNAsa I, 40 µl de MgSO₄ al 3.8% y 5.2 mg de inhibidor de tripsina. El tejido se disoció hasta que se observó una suspensión homogénea, la cual se pasó a través de una jeringa con malla de nylon de 60µm de poro. El filtrado se recuperó y depositó en un tubo con *Solución 5*: 5 ml de *Solución 1*, 30 µl de MgSO₄, y 6 µl de CaCl₂. Se centrifugó a 1000 rpm por 6 min y se retiró el sobrenadante. El pellet fue disuelto en medio de cultivo para astrocitos (Basal Medium Eagle con sales de Earle, 33 mM de glucosa, 2 mM de glutamina y 10% de suero fetal bovino). Finalmente, las células fueron sembradas en cajas Petri y se dejaron crecer por 12 días a 37°C en 5% de CO₂ en atmósfera humidificada. Después de este lapso se cambió el medio por medio fresco cada tres días hasta que alcanzaran la confluencia deseada (~70%) para someterlas a los diferentes tratamientos.

La pureza del cultivo fue >90% y fue verificada por inmunofluorescencia usando como marcador de astrocitos a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y como marcador de neuronas a la proteína nuclear neuronal (NeuN)

5.3 Tratamientos

Dos horas antes de aplicar los tratamientos, se realizó el cambio de medio a los cultivos por medio fresco con o sin suero. Pasado este tiempo, se adicionó al medio: (1) colesterol [25 ó 50 µM] por 48 h ó lovastatina (inhibidor de la síntesis de colesterol) [10 µM] por 24 o 48 h, (2) colesterol [25 ó 50 µM] por 48h con y sin el antioxidante Euk-134 (con actividad de SOD y catalasa) [25 µM] por 24 h y (3) H₂O₂ [25 µM] por 2 h. El colesterol fue disuelto en etanol (a una concentración final de 0.3%) y añadido a los cultivos. Los cultivos controles fueron expuestos al vehículo (0.3% de etanol) y el colesterol total fue usado a una concentración final de 132.33 µM en el cultivo. El colesterol añadido exógenamente [25 o 50 µM] incrementó el colesterol total en un 30 y 60% respectivamente. El colesterol

fue medido por el método de Amplex Red Cholesterol Assay Kit que permite la detección de colesterol libre y ésteres de colesterol. Este método se basa en reacciones enzimáticas, donde los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol esterasa para dar lugar al colesterol que posteriormente es oxidado por la colesterol oxidasa generando H_2O_2 , que al reaccionar con el reactivo Amplex Red produce el compuesto resorufina que puede ser detectado mediante fluorescencia. Una vez terminado el tiempo de incubación con colesterol, se retiró el medio y se conservó a $-80^\circ C$ para posteriormente realizar el ensayo de ELISA y para la detección de sAPP α y sAPP β por Western blot. Las células se lavaron una vez con PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4O , 2 mM KH_2PO_4O , pH 7.4) y se les agregó buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% doxicolato de sodio, inhibidor de proteasas) para después someterlas a Western blot o co-inmunoprecipitación.

5.4 Tinción de colesterol

Para detectar la incorporación del colesterol a los astrocitos se utilizó la tinción con Filipina III que une específicamente colesterol no esterificado (Börnig and Geyer, 1974). Las células se dejaron crecer en un cubreobjetos en cajas de 24 pozos. Una vez que las células fueron tratadas, se lavaron tres veces en PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4O , 2 mM KH_2PO_4O , pH 7.4) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PB 0.1M (0.1 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0.1 M $NaHPO_4$, pH 7.4) por 5 min. Posteriormente fueron bloqueadas y permeabilizadas en PBS 1X con 0.2% de Triton X-100 y se incubaron en oscuridad con 100 ng/ml de Filipina III en PBS 1X por 2 h. Al terminar la incubación, las células fueron lavadas por 10 min tres veces en PBS 1X y se observaron en el microscopio invertido con magnificaciones de 20 y 40X a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión.

5.5 Detección de balsas lipídicas

Para detectar las balsas lipídicas en la membrana, se utilizó el marcaje con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) que se une al gangliósido de membrana GM1. Este gangliósido, junto con el colesterol, es un componente esencial de las balsas lipídicas. Los astrocitos fueron cultivados en cubreobjetos en cajas de 12 pozos. Posterior al tratamiento con colesterol 50 μM por 48 h, el medio fue removido y las células fueron tratadas con 1 $\mu g/ml$

de CTB unido a Alexa Fluor 555 (Blank et al., 2007) por 2 h antes de ser fijadas con paraformaldehído 1%/PB 0.1 M (0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 M NaHPO_4 , pH 7.4) por 5 min. Después de tres lavados con PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{O}$, 2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{O}$, pH 7.4) los astrocitos se incubaron con el marcador nuclear Hoechst por 20 min y fueron observados usando el microscopio confocal.

5.6 Western blot

Una vez tratadas o no, las células fueron lavadas con PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{O}$, 2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{O}$, pH 7.4) y lisadas a 4°C con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% doxicolato de sodio, inhibidor de proteasas). Una vez obtenidos los lisados celulares, el contenido de proteína fue medido usando el ensayo de Bio-Rad DC™ protein assay kit. Las muestras fueron sonicadas 10 seg tres veces a 40 kHz y se les agregó la mitad del volumen de buffer de carga SDS 2X (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 2% ditiotreitól, 5% β -mercaptoetanol, pH 6.8). Posteriormente, se calentaron a 100°C por 10 min, se corrieron en geles SDS-PAGE al 10, 12 ó 15% de poliacrilamida-tris-glicina y fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con buffer de bloqueo (5% leche libre de grasa ó 5% de BSA, 0.1% de Tween en TBS 1X: 2 mM Tris base y 13.7 mM NaCl) a temperatura ambiente por 1 h, seguido de tres lavados (TBS 1X-0.1% Tween) de 10 min cada uno. Después de los lavados, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos para: APP total y sAPP α (APP 22C11) (1:1000), C-99 y C-83 (APP A4 (I-17)), sAPP β (APP (EPR5118)) (1:1000), BACE-1 (1:500), GFAP (1:1000), β -actina (1:1000) toda la noche a 4°C o dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron tres lavados y las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa de rábano (HRP): goat anti-mouse (1:5000), goat anti-rabbit (1:6000) o chicken anti-goat (1:20000) por 2 h a temperatura ambiente. Las proteínas se detectaron usando el kit de quimioluminiscencia Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate y las placas de autoradiografía Kodak BioMax Light Films. Para la cuantificación relativa de la inmunoseñal, la intensidad de las bandas fue analizada con el software ImageJ versión 1.42q.

5.7 Co-inmunoprecipitación

La co-inmunoprecipitación se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante de la proteína A-agarosa con algunas modificaciones. Una vez lisadas las células, la cantidad de proteína se determinó con el kit Bio-Rad DC™ protein assay kit y se prepararon lisados a una concentración de 1 µg/µl. Posteriormente, a 500 µg del lisado celular se le añadió el anticuerpo primario contra APP 22C11 (10 µg/ml) y la mezcla fue dejada en agitación suave toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, se agregaron 100 µl de la proteína A-agarosa para capturar el inmunocomplejo y se dejó 2 h a 4°C en agitación suave. Las perlas de agarosa fueron colectadas por microcentrifugación a 14 000 xg por 5 seg y después lavadas tres veces con PBS 1X frío (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄O, 2 mM KH₂PO₄O, pH 7.4). Una vez lavadas, las perlas se resuspendieron en buffer de Laemmli (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 2% ditiotretitol, 5% β-mercaptoetanol, pH 6.8) y fueron hervidas por 5 min. Finalmente las perlas se colectaron nuevamente por microcentrifugación y mediante SDS-PAGE e inmunoblot se detectó a BACE-1.

5.8 Inmunofluorescencia

Los astrocitos fueron crecidos en cubreobjetos en cajas de 12 pozos. Una vez que alcanzaron el 70% de confluencia, se retiró el medio y fueron fijados con paraformaldehído al 4% en 0.1 M de PB (0.1 M NaH₂PO₄•H₂O, 0.1 M NaHPO₄, pH 7.4) por 20 min sobre hielo. Se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PB 0.1 M más Tritón X-100 0.3% frío y posteriormente las células fueron dejadas con solución de bloqueo (PB 0.1 M, Tritón X-100 0.3% y BSA 0.5%) toda la noche a 4°C o a temperatura ambiente por 2 h. Una vez realizado el bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario: GFAP (1:1000), NeuN (1:500), APP 22C11 (1:1000) ó BACE-1 (1:1000) en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Las células fueron lavadas dos veces por 3 min con PB 0.1 M/Tritón X-100 0.3% en agitación lenta y después incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes: goat anti-rabbit Alexa Flúor 546 (1:1000), donkey anti-mouse Alexa Flúor 488 (1:1000), goat anti rabbit Alexa Flúor 488 (1:1000) en solución de bloqueo por toda la noche a 4°C o a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, las células se lavaron tres veces 3 min con solución de lavado y se incubaron con Rojo radiante (1:1000) o Höechst (10 min y 20

min respectivamente) para marcar el núcleo. Finalmente, las células fueron lavadas tres veces 5 min cada vez y montadas en portaobjetos con medio de montaje fluorescente. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio confocal, DSU o invertido. La reactividad cruzada fue excluida usando controles apropiados (células incubadas en las mismas soluciones pero sin anticuerpos primarios).

5.9 ELISA de A β 42 y A β 40

Los péptidos A β 42 y A β 40 tanto secretados al medio de cultivo como intracelulares fueron medidos mediante el ensayo de ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los astrocitos, una vez confluentes, fueron tratados o no con colesterol y el medio de cultivo fue recolectado (para el A β secretado al medio) y sometido a centrifugación a 4500 rpm por 5min para finalmente utilizar el sobrenadante para la prueba de ELISA. Para el A β intracelular, las células fueron levantadas con buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% doxicolato de sodio, inhibidor de proteasas). Posteriormente se utilizó una caja de 96 pozos cubiertos con un anticuerpo específico para el fragmento amino terminal del A β humano. Para la realización de la curva patrón de los péptidos A β 42 y A β 40 se utilizaron diluciones de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 y 0 pg/ml. Las muestras fueron diluidas a las concentraciones apropiadas para la prueba y añadidas a los pozos correspondientes. Posteriormente se añadieron los anticuerpos contra A β 42 ó A β 40 y se dejaron en incubación por 3 h a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados y se agregó el anticuerpo secundario rabbit IgG HRP dejándolo 30 min. Después de la incubación, se agregó el buffer de inactivación y la absorbancia de cada muestra fue medida usando un espectrofotómetro. Los niveles de los péptidos fueron normalizados con respecto al total de proteína de cada lisado celular o medio.

5.10 Medición de ROS por dihidroetidio

Los astrocitos fueron cultivados de la misma manera que en el protocolo para inmunofluorescencia. Los tratamientos fueron dos: (1) 25 y 50 μ M de colesterol por 48 h, y (2) 25 y 50 μ M de colesterol más 25 μ M del antioxidante Euk-134 por 24 h. Después de los tratamientos, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron incubadas con 2 μ M de dihidroetidio por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron fijadas

con paraformaldehído 1% en PB 0.1 M (0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 M NaHPO_4 , pH 7.4) por 5 min, lavadas tres veces con PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) e incubadas con Höchst por 20 min. Finalmente, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X y observadas a magnificaciones 5X en un microscopio invertido a 535 nm de excitación y 610 nm de emisión. Como control positivo de la formación de ROS, las células fueron tratadas con 25 μM de H_2O_2 por 2 h.

5.11 Medición de ROS por dihidrorodamina

La producción de ROS fue determinada con el ensayo fluorométrico que emplea la dihidrorodamina 123 (DHR) (Lee et al., 2003), cuando la DHR es oxidada por H_2O_2 con la presencia de peroxidasas, se produce el compuesto fluorescente rodamina 123 (RDH) (Gomes et al., 2005). Los astrocitos fueron cultivados en cajas de 12 pozos y tratados con: (1) 25 y 50 μM de colesterol por 48 h, y (2) 25 y 50 μM de colesterol más 25 μM de Euk-134 por 24 h. Después de los tratamientos, las células fueron lavadas con 100 μl de PBS 1X por pozo y posteriormente levantadas con 200 μl de solución de inhibidores de proteasas (25 ml PBS 1X y una tableta del inhibidor de proteasas COMPLETE) por pozo. Una vez que las células fueron resuspendidas, 100 μl del homogenado fue centrifugado a 1200 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 180 μl del buffer A que contiene: NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgSO_4 0.8 mM, CaCl_2 1.8 mM, glucosa 5 mM, HEPES 15 mM y 20 μl de DHR 1 μM . El pellet se incubó a 37°C por 2 min. El producto RDH fue medido usando un espectrofotómetro con el filtro de 505 nm.

5.12 Análisis Estadístico

La significancia estadística fue determinada por ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* mediante el software GraphPad Prism 4. Al menos, tres cultivos independientes de astrocitos provenientes de un pool de 5 cortezas fueron analizados en cada experimento. Los datos fueron presentados como el valor \pm la desviación estándar y una $p < 0.05$ fue considerada significativa.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización del cultivo

Para confirmar que en los cultivos primarios obtenidos se encuentran mayoritariamente astrocitos, se detectó a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que es un

marcador de astrocitos. Mediante inmunofluorescencia se observó la presencia de GFAP en las células cultivadas (Figura 1A), lo cual indica que en el cultivo obtenido existe gran cantidad de estas células gliales.

Para descartar la presencia de neuronas en el cultivo primario, se realizó una doble inmunofluorescencia con el marcador de neuronas maduras NeuN y el marcador de astrocitos GFAP. Esto se hizo tanto en el cultivo de astrocitos (Figura 1B, panel derecho) como en la línea celular de neuroblastoma humano (MSN) diferenciado a neuronas (Figura 1B, panel izquierdo). En el caso del cultivo neuronal, se observó a NeuN y no se detectó a la proteína GFAP. De manera contraria a las MSN, el cultivo primario fue positivo para GFAP y no se observó presencia de NeuN. Con este resultado se comprobó que no hay presencia de neuronas en el cultivo primario obtenido y que las células son en su mayoría astrocitos. A pesar de que no se marcaron otras proteínas para identificar a la microglía y a los oligodendrocitos, la metodología seguida para la obtención del cultivo primario de astrocitos reporta un porcentaje de pureza >90% (Patel and Hunt, 1985; Morán and Patel 1989).

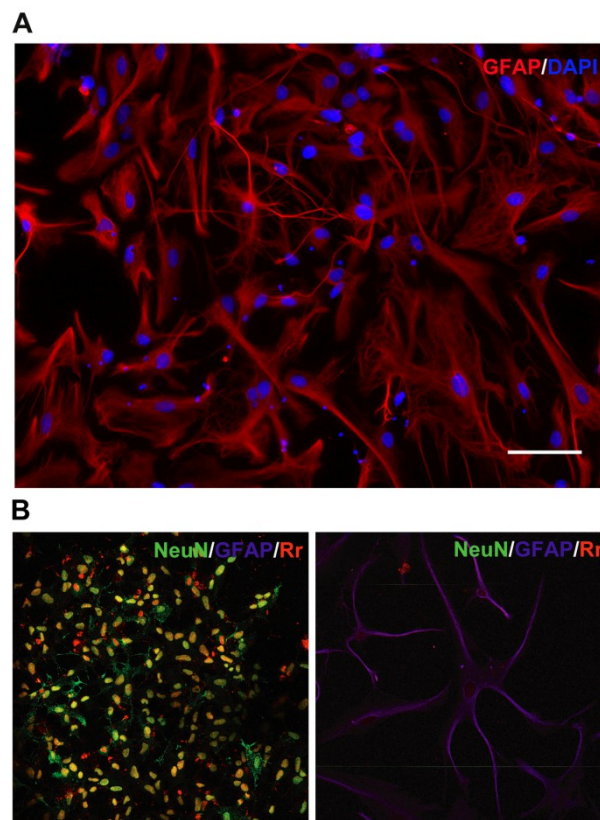


Figura 1. Detección de GFAP y NeuN en el cultivo primario de astrocitos y en la línea celular MSN. Los cultivos fueron obtenidos de acuerdo al protocolo descrito. **(A)** Mediante inmunofluorescencia se detectó a GFAP (rojo) como marcador de astrocitos. **(B)** La pureza del cultivo primario (panel derecho) fue verificada mediante inmunofluorescencia, usando como control negativo a las células de neuroblastoma humano (MSN) (panel izquierdo). NeuN en verde, GFAP en azul, y rojo radiante (Rr) como marcador de núcleo en rojo. La pureza del cultivo fue <90%.

6.2 El colesterol promueve la formación de balsas lipídicas

Para investigar el efecto del colesterol en la morfología y metabolismo de los astrocitos, primero se determinó el grado de incorporación del colesterol, añadido al medio, en los astrocitos. Las células fueron teñidas con filipina después de ser expuestas a 25 y 50 μM de colesterol por 48 h. La Figura 2A muestra que la incorporación del colesterol es dependiente de la dosis y que se distribuye a lo largo del soma y los procesos de los astrocitos. Como un marcador de glicosfingolípidos componentes de las balsas lipídicas, se usó a la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), la cual se une específicamente al gangliósido GM1 (Orlandi and Fishman, 1998; Kenworthy et al., 2000). Se encontró que el colesterol regula a la alta la inmunoseñal de CTB que corresponde a los sitios en donde el colesterol fue marcado con filipina (Fig. 2B).

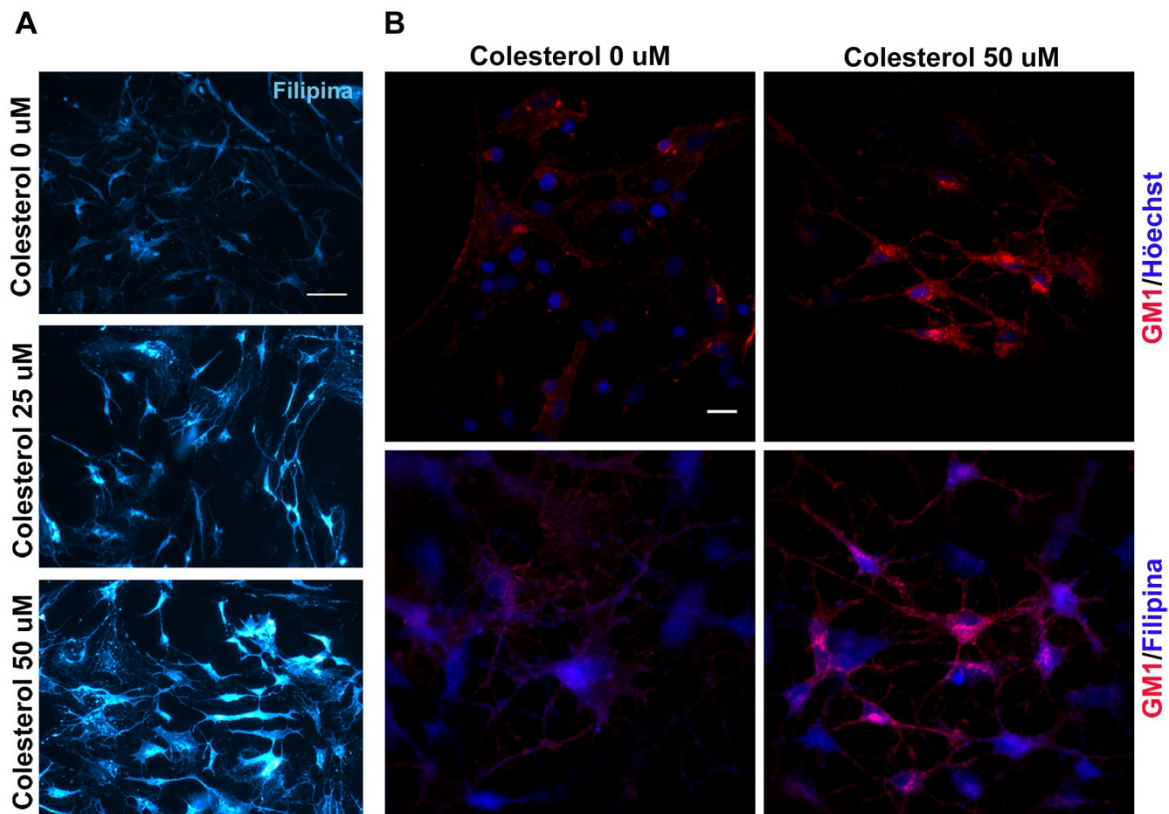


Figura 2. Incorporación de colesterol y localización de GM1 en astrocitos. Los astrocitos fueron incubados con 25 y 50 μM de colesterol por 48 h. **(A)** Las células fueron teñidas con 100 ng/ml de filipina (azul cielo). 10X. Barra de escala: 80 μm . **(B)** Los astrocitos fueron tratados con 50 μM de colesterol por 48 h. Panel superior: las células fueron marcadas con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) para detectar al gangliósido de membrana GM1 (rojo) y con H \ddot{o} echst el núcleo (azul); Panel inferior: los astrocitos fueron marcados con CTB (rojo) y filipina (azul). 10X. Barra de escala: 80 μm .

6.3 El colesterol induce la activación de los astrocitos

La exposición al colesterol indujo cambios en la morfología del astrocito que fueron caracterizados por la inmunofluorescencia de la proteína de filamentos intermedios GFAP (Fig. 3A). Astrocitos control exhibieron procesos estelados y una morfología poligonal típica de los cultivos de astrocitos en monocapa. Posterior al tratamiento con colesterol se observa un incremento significativo (50 y 100%) de la proteína GFAP, indicando el estado activado de los astrocitos (Fig. 3B).

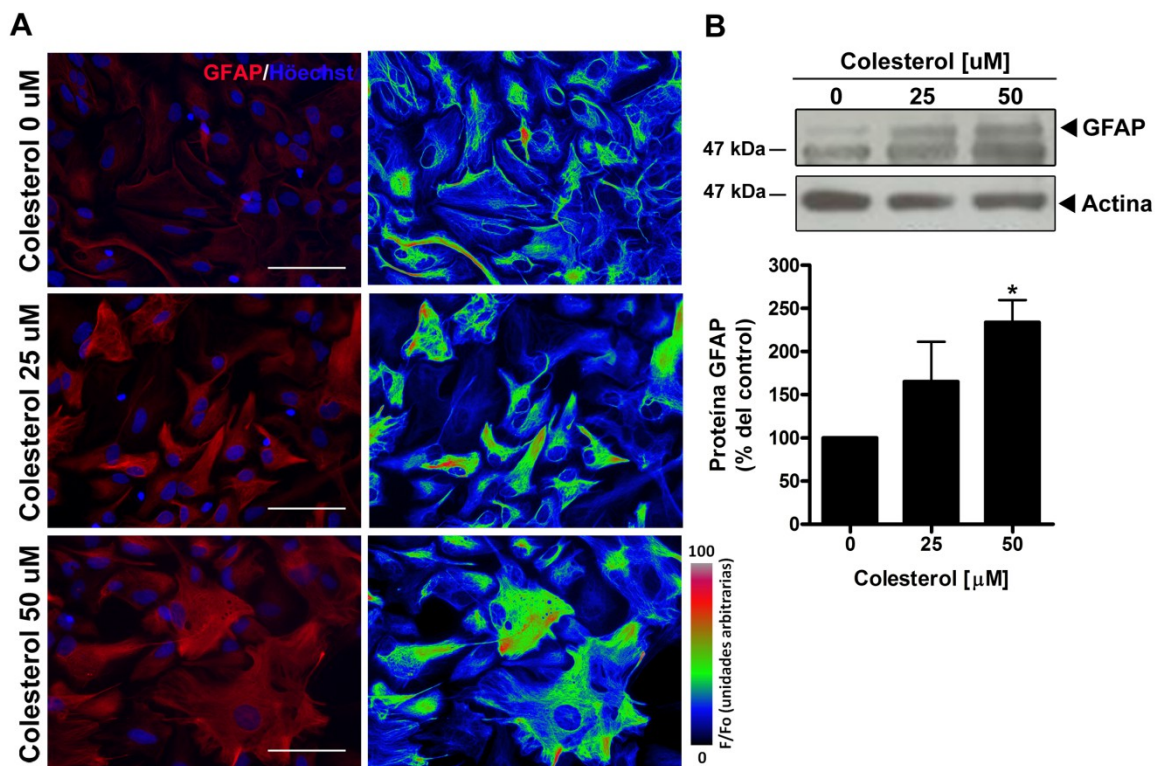


Figura 3. El colesterol induce la activación de los astrocitos. Los astrocitos fueron incubados con 25 y 50 μM de colesterol por 48 h. **(A)** Páneos izquierdos: los astrocitos fueron marcados con GFAP (rojo) y H \ddot{o} echst (azul); Páneos derechos: la señal de fluorescencia fue convertida a un despliegue de arcoiris para el análisis de intensidad. 20X. Barra de escala: 80 μm . **(B)** Los niveles de la proteína GFAP fueron detectados mediante western blot. El análisis densitométrico de las bandas de GFAP fue normalizado con los niveles correspondientes de β -actina. \pm SEM de n=4. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p < 0.01 v.s. control.

6.4 El contenido de colesterol modula los niveles de APP

Se ha observado que en neuronas el colesterol afecta el procesamiento de APP y el tráfico aberrante de colesterol se ha asociado con la producción de A β en el cerebro (Burns et al., 2003). Sin embargo, se sabe poco del efecto del colesterol en el metabolismo de la APP en astrocitos, por lo cual se decidió evaluar primero si la acumulación de colesterol afecta los niveles de APP. Se encontró mediante inmunocitoquímica y western blot, un incremento de dos y tres veces en los niveles de APP después de la exposición a 25 o 50 μ M de colesterol respectivamente. La distribución de APP fue significativamente mayor en el soma, pero también notablemente elevada en la región correspondiente a la membrana celular (Fig. 4A y B). Para analizar la modulación de los niveles de APP inducida por colesterol, los astrocitos fueron incubados con lovastatina en medio libre de suero para inhibir la síntesis endógena del colesterol y reducir el contenido de este en los astrocitos. Se utilizó medio sin suero ya que el colesterol presente en este encubría la inhibición de la síntesis del colesterol por la lovastatina. Se observó que a las 48 h la lovastatina disminuye en un 25% aproximadamente, los niveles de APP comparados con los controles (Fig. 4C). Para descartar el efecto de la privación de suero en los niveles de APP y que el resultado obtenido con la lovastatina fuera debido a su acción inhibitoria de la síntesis de colesterol, astrocitos controles fueron incubados en medio sin suero por 24 y 48 h. Se encontró que después de 24 h, se observa un incremento significativo de APP. Sin embargo, a las 48 h los niveles de APP fueron similares en presencia o ausencia de suero (Fig. 4D), indicando que la reducción de los niveles de APP a las 48 h de tratamiento con lovastatina (Fig. 4C) es debida a la inhibición de la síntesis de colesterol y no a la ausencia del suero.

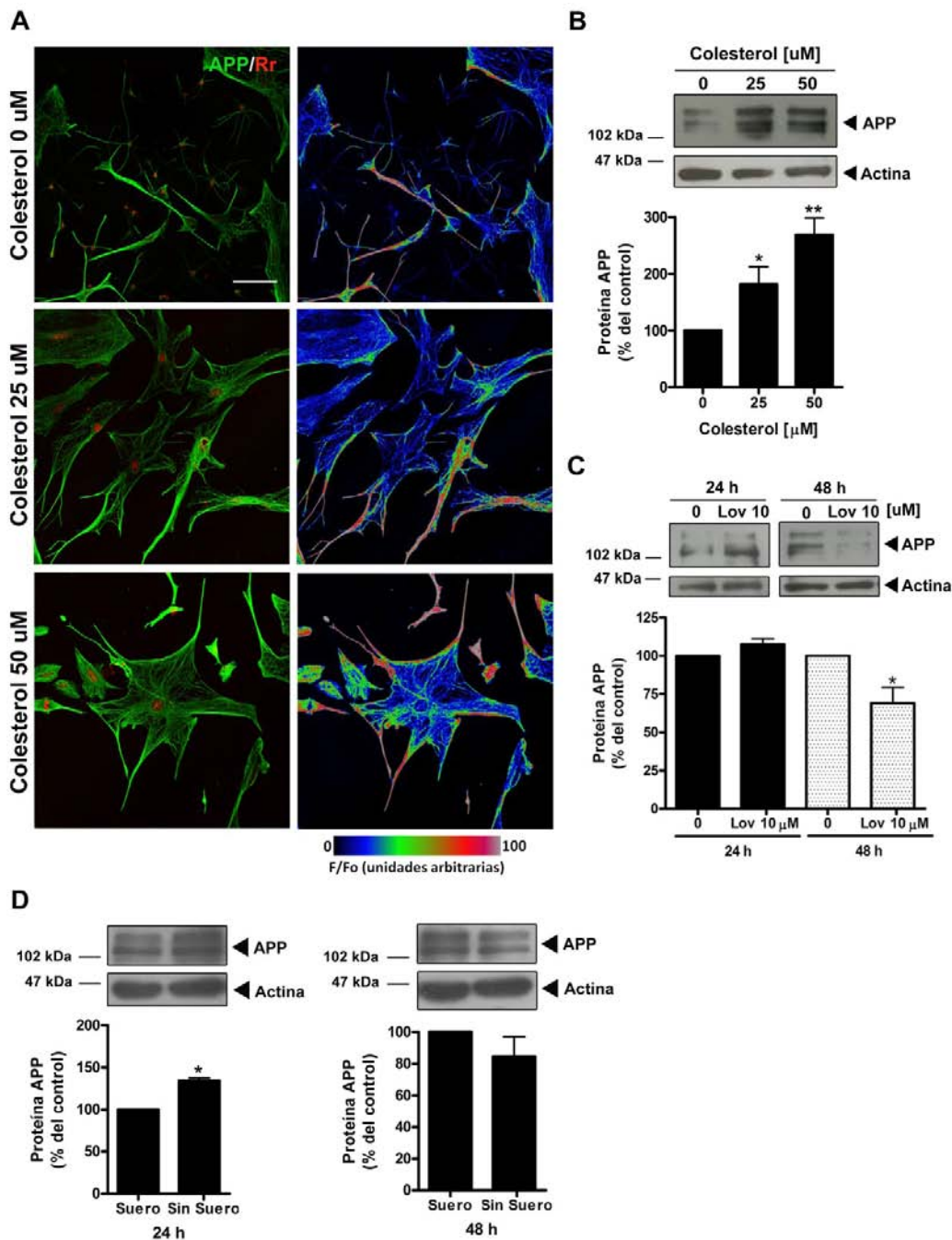


Figura 4. Efecto del colesterol en los niveles de la APP. Los astrocitos fueron incubados con 25 o 50 μM de colesterol por 48 h. **(A)** Páneos izquierdos: inmunofluorescencia contra APP (verde) y núcleo (Rr, rojo radiante); Páneos derechos: la señal de fluorescencia convertida a despliegue de arcoíris para el análisis de la intensidad. 20X. Barra de escala: 80 μm . **(B)** Los niveles de APP fueron detectados por western blot y normalizados con los niveles correspondientes de β -actina. $\pm\text{SEM}$ de $n=4$. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; * $p < 0.05$ v.s. control ** $p < 0.01$ v.s. control. **(C)** Los astrocitos fueron tratados con 10 μM de lovastatina por 24 y 48 h en medio sin suero. La proteína APP fue detectada por western blot y el análisis densitométrico de las bandas de APP fue normalizado con las bandas correspondientes de β -actina. $\pm\text{SEM}$ de $n=4$. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; * $p < 0.01$ v.s. control. **(D)** Los astrocitos fueron incubados en medio con 10% de suero o sin suero durante 24 h (imagen izquierda) y 48 h (imagen derecha). La proteína APP fue detectada mediante western blot y los datos fueron normalizados con respecto a la proteína β -actina. $\pm\text{SEM}$ de $n=3$ para 24 h y 48 h. t de Student; * $p < 0.05$ v.s. control.

6.5 La expresión de APP inducida por colesterol es prevenida por Euk-134

Para determinar el mecanismo potencial involucrado en la sobreexpresión de APP inducida por colesterol, se midió la producción de ROS y el efecto del antioxidante Euk-134 que tiene actividad de SOD y catalasa previniendo la formación de superóxido y peróxido de hidrógeno. Como se muestra en la Figura 5, el colesterol incrementa el número de células positivas a dihidroetidio, mientras que el tratamiento con el antioxidante previene este incremento (Fig. 5A y B). Además del análisis con dihidroetidio, se analizó el papel del colesterol en la producción de ROS mediante el incremento de la presencia de rodamina 123, obteniéndose resultados similares (Fig. 5C). Cuando los astrocitos fueron incubados en presencia del colesterol y del antioxidante Euk-134, los niveles de APP se redujeron significativamente (Fig. 5D). Esto indica que el ambiente redox producido por niveles altos de colesterol juega un papel importante en la expresión de APP.

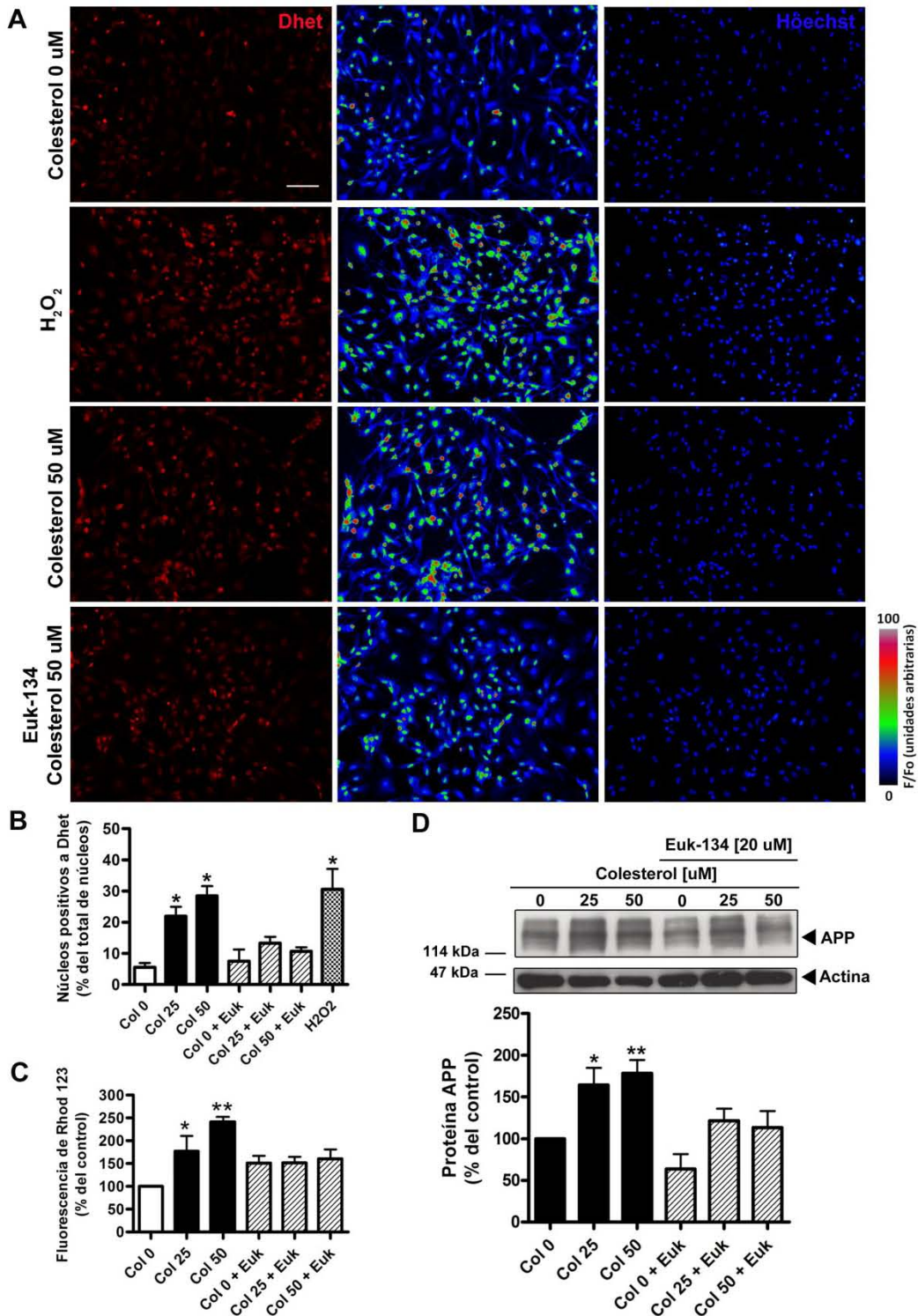


Figura 5. El efecto del colesterol en los niveles de la proteína APP es modulado por la inducción de ROS. (A) Los astrocytes fueron incubados con 25 o 50 μM de colesterol por 48 h y/o Euk-134 por 24 h. La generación de ROS fue detectada usando el ensayo de dihidroetidio (Dhet). Paneles derechos: fluorescencia de Dhet (rojo); Paneles centrales: la señal de fluorescencia fue convertida a un despliegue de arcoiris para el análisis de la intensidad; Paneles izquierdos: núcleos marcados con H \ddot{o} chst (azul). 10X. Barra de escala: 80 μM . (B) Los astrocytes fueron incubados con 25 o 50 μM de colesterol por 48 h y/o Euk-134 por 24 h. Los núcleos positivos a Dhet fueron detectados y contados. La cuantificación representa el porcentaje de núcleos

positivos a Dhet relativo al número total de núcleos marcados con H₂O₂. Los núcleos fueron contados en seis campos visuales aleatorios del microscopio por experimento. Como control positivo de la formación de ROS, los astrocitos fueron incubados con 25 μ M de H₂O₂ por 2 h. \pm SEM de n=4. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p<0.01 v.s. control. **(C)** Los astrocitos fueron incubados con 25 o 50 μ M de colesterol por 48 h y/o Euk-134 por 24 h. La fluorescencia de la rodamina 123 (RDH) fue cuantificada y presentada como el porcentaje relativo a las células control expuestas al vehículo. \pm SEM de n=5. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p<0.05 v.s. control **p<0.01 v.s. control. **(D)** Los niveles de APP fueron detectados por western blot después del tratamiento con colesterol en presencia o ausencia del antioxidante Euk-134. El análisis densitométrico de APP fue normalizado con respecto a los niveles correspondientes de β -actina. \pm SEM de n=3-4. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p <0.05 v.s. control **p<0.01 v.s. control.

6.6 El colesterol incrementa los niveles de BACE-1 y promueve su asociación con APP

La expresión de BACE-1 fue detectada en astrocitos sin tratamiento. Se sabe que existe un aumento de BACE-1 en modelos de EA y después de un daño (Roßner et al., 2001; Hartlage-Rubsamen et al., 2003). Los efectos del colesterol sobre el aumento de APP fueron acompañados también por un aumento significativo de BACE-1 cuando el colesterol fue añadido a una concentración de 50 μ M (Fig. 6A y B). La distribución celular de BACE-1 fue observada, de manera similar a lo descrito en cultivos neuronales, a manera de puntilleo cerca del núcleo de la célula (Fig. 6A) (Patil et al., 2006). Se sabe que el procesamiento de APP mediado por BACE-1 en neuronas es favorecido en membranas lipídicas enriquecidas con colesterol. Para investigar si la asociación de APP con BACE-1 se encontraba incrementada en astrocitos tratados con colesterol, se realizó una co-inmunoprecipitación que mostró que la interacción de APP/BACE-1 es promovida por el colesterol (Fig. 6C).

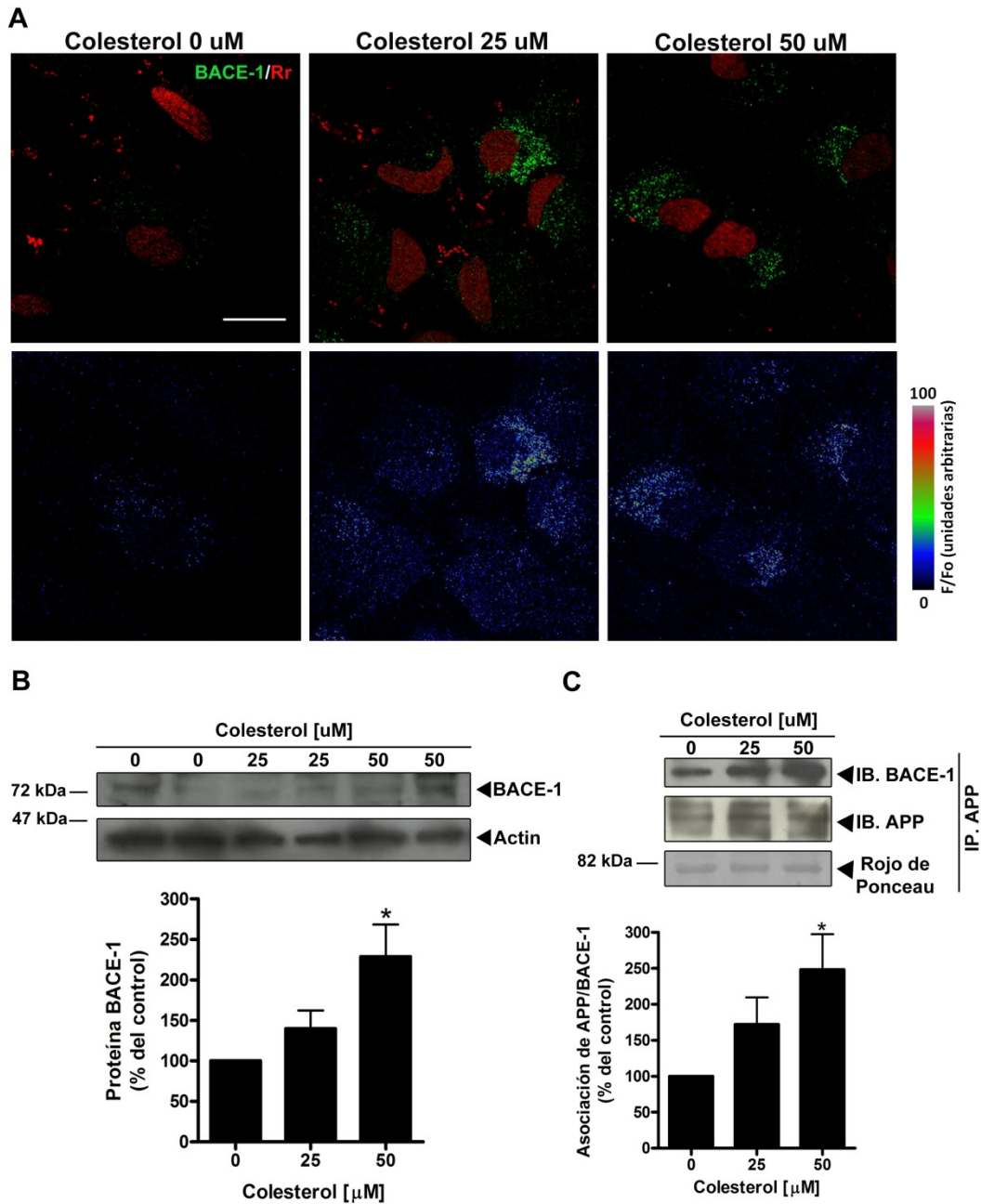


Figura 6. El colesterol modula los niveles de la proteína BACE-1 y su interacción con APP. Los astrocitos fueron incubados con 25 o 50 μM de colesterol por 48 h. **(A)** Páneos superiores: inmunofluorescencia contra BACE-1 (verde) y núcleo (Rr, rojo radiante); Páneos inferiores: la señal de fluorescencia fue convertida a un despliegue de arcoíris para el análisis de intensidad. 100X. Barra de escala 20 μm . **(B)** Los niveles protéicos de BACE-1 fueron detectados por western blot y normalizados con los niveles correspondientes de β -actina. $\pm\text{SEM}$ de $n=4$. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; * $p < 0.01$ v.s. control. **(C)** Co-inmunoprecipitación. Fila superior: APP fue inmunoprecipitada y BACE-1 fue detectada por western blot; fila central: APP fue inmunoprecipitada y APP fue detectada por western blot; fila inferior: una proteína tomada al azar teñida con rojo de Ponceau fue usada como control de carga. La cuantificación se realizó normalizando los valores correspondientes a la fila superior con los correspondientes de la fila central. $\pm\text{SEM}$ de $n=3$. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; * $p < 0.05$ v.s. control.

6.7 El colesterol modula el procesamiento amiloidogénico de APP

Se sabe que BACE-1 corta a APP en el sitio Asp+1 para generar el fragmento C-99 que se queda anclado a la membrana y que posteriormente es cortado por la γ -secretasa durante la vía de procesamiento amiloidogénica de APP. En consecuencia, se determinó si la regulación a la alta de BACE-1 en respuesta a la incubación con colesterol afecta el procesamiento de APP en el sitio de β -secretasa. De manera similar a resultados previos, se encontró que los niveles del fragmento C-99 están elevados en astrocitos tratados con colesterol (Fig. 7A). Ya que el colesterol parecía regular la vía amiloidogénica, se analizó la formación de los péptidos A β 42 y A β 40. Se observó un ligero, pero significativo, incremento en la secreción de A β 40 detectado en el medio, mientras no se observaron cambios en A β 42 (Fig. 7C). Debido a que los astrocitos tienen la capacidad de capturar y degradar a A β , también se midió el contenido intracelular de A β 42 y A β 40 después de la exposición a colesterol. A pesar de que no se observó modificación alguna en el contenido de los péptidos A β a ninguna dosis en este estudio (Fig. 7D), se encontró una reducción significativa del fragmento soluble sAPP α , el cual es el producto secretado del metabolismo no amiloidogénico de APP, así como un incremento significativo del fragmento sAPP β que es producto de la actividad de BACE-1 (Fig. 7B). Estos resultados están en concordancia con el incremento del procesamiento amiloidogénico de la APP promovido por el colesterol.

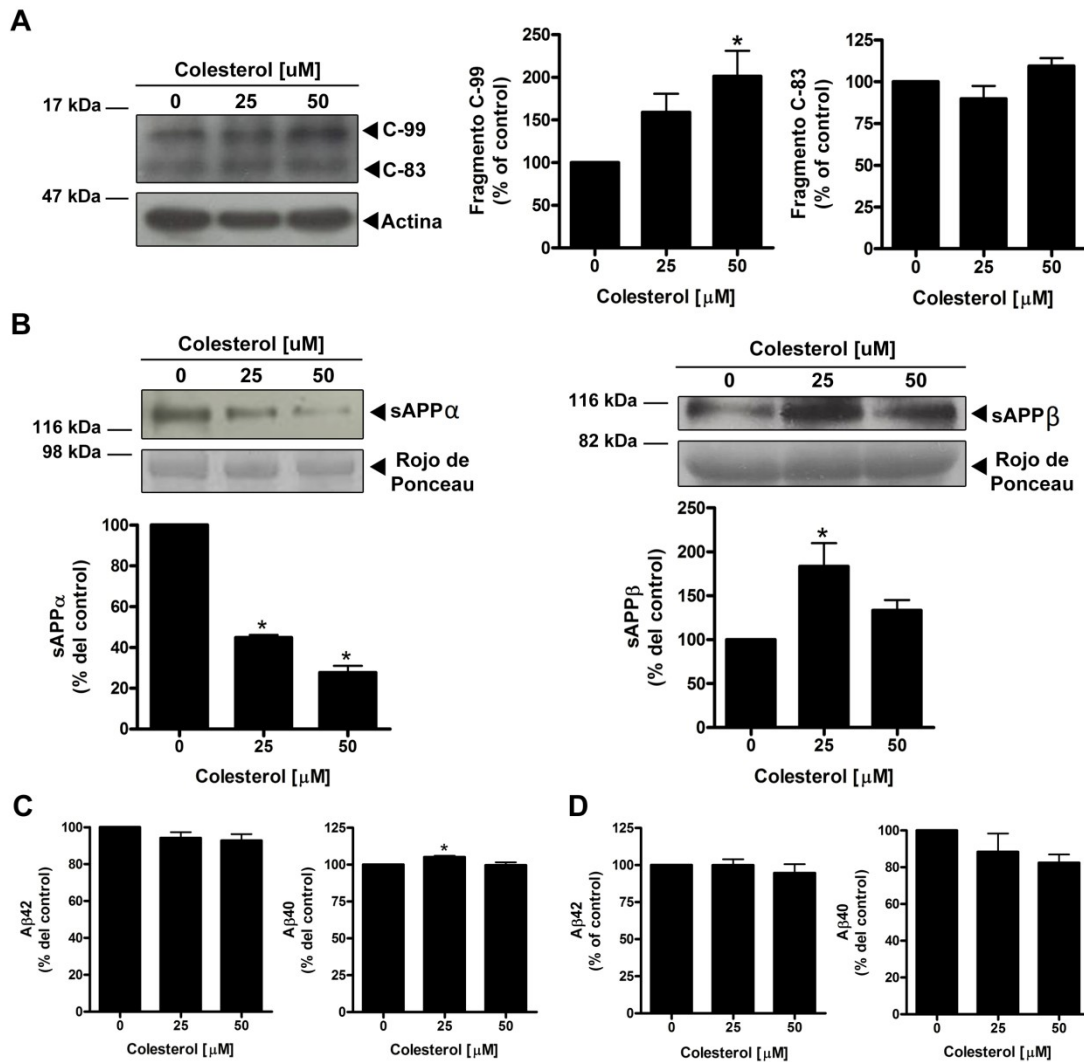


Figura 7. El colesterol modula el procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la APP. Los astrocitos fueron incubados con 25 y 50 μ M de colesterol por 48 h. **(A)** Blot representativo y análisis densitométrico de los fragmentos C-99 y C-83. \pm SEM de n=3. ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p <0.05 v.s. control. **(B)** Los fragmentos secretados sAPP α (izquierda) y el sAPP β (derecha) fueron detectados por western blot: para sAPP α se cargaron 30 μ g de proteína y para sAPP β se cargaron 90 μ g de proteína. Para el análisis densitométrico los valores correspondientes a las bandas de sAPP α y sAPP β fueron normalizados con los valores obtenidos de una proteína tomada al azar teñida con rojo de Ponceau. sAPP α : \pm SEM de n=5 y ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p <0.01 v.s. control. sAPP β : \pm SEM de n=4 y ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p <0.05. **(C)** Los péptidos A β 42 y A β 40 secretados al medio fueron detectados por el ensayo de ELISA. A β 42: \pm SEM de n=4 y ANOVA con *post hoc* de Dunnett. A β 40: \pm SEM de n=5 y ANOVA con *post hoc* de Dunnett; *p <0.05 v.s. control. **(D)** Los péptidos A β 42 y A β 40 intracelulares fueron detectados mediante en ensayo de ELISA. A β 42 y A β 40: \pm SEM de n=4. ANOVA con *post hoc* de Dunnett.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo se enfocó en estudiar el papel del incremento de las concentraciones de colesterol en el procesamiento de la APP en astrocitos primarios de corteza. Se sabe que los astrocitos activados se encuentran presentes en cerebros de pacientes con EA y en modelos transgénicos de la enfermedad (Carter et al., 2012; Kamphuis et al., 2012; Pekny et al., 2014). De hecho, la gliosis reactiva parece preceder a las lesiones características de EA (Roßner et al., 2001; Uryu et al., 2002; Hartlage-Rubsamen et al., 2003; Robner et al., 2005; Wharton et al., 2009), sugiriendo el papel de la activación glial en la expresión de estos marcadores. Diversos grupos de trabajo han intentado dilucidar la función de los astrocitos en la patología de EA y se han enfocado principalmente en el efecto que tienen las placas amiloides y el A β en la pérdida de homeostasis del astrocito. En este sentido, ha propuesto que es vía la neuroinflamación que la disfunción metabólica de los astrocitos contribuye a la patología de la EA.

En este estudio se encontró que los niveles altos de colesterol inducen el aumento de la proteína GFAP, lo cual sugiere la activación de los astrocitos, y aumentan la expresión y metabolismo de la APP. Los resultados también demuestran que las modificaciones en los niveles de colesterol regulan la asociación entre APP y BACE-1 y que los astrocitos expuestos al compuesto lovastatina, que disminuye el colesterol, reducen de manera significativa los niveles de APP.

La hipótesis del colesterol en EA es aún controversial, considerando que no se han encontrado cambios significativos de manera consistente en los niveles de colesterol en suero/plasma y en cerebros de pacientes con EA, además de que se sabe que el colesterol no cruza la barrera hematoencefálica (revisado en Wood et al., 2014). No obstante, en los trabajos donde se reportan niveles altos de colesterol se ha encontrado que en los pacientes con EA el colesterol en plasma está elevado en un 10% (Popp et al. 2013) y en la corteza frontal los niveles son más altos que en los sujetos controles (Sparks 1997). Además, uno de los factores que aumenta la probabilidad de desarrollar la EA es la expresión de la proteína ApoE ϵ 4 (Puglielli et al., 2003; Evans et al., 2004; Bu et al., 2009; Kim et al., 2009; Martins et al., 2009; Schipper, 2011), la cual transporta colesterol en el cerebro y es secretada por los astrocitos para satisfacer la demanda de colesterol de las neuronas (Xu et al., 2006). Aunado a esto, se han encontrado niveles elevados de APP, BACE-1, γ -secretasa y A β en modelos animales de la enfermedad de Niemann-Pick, donde

existe una acumulación importante de colesterol en el cerebro. Los niveles elevados de las proteínas se han detectado no solo en neuronas sino también en astrocitos activados (Kodam et al., 2010). Estos datos sugieren que cambios en el transporte, contenido, y por lo tanto, en la homeostásis del colesterol a nivel cerebral son importantes en el desarrollo de la EA. Más aún, se ha observado en neuronas que el colesterol puede alterar el microambiente lipídico de la membrana, de manera tal que promueve la formación y aumento de las balsas lipídicas favoreciendo un ambiente fisicoquímico óptimo para la actividad de BACE-1 y el consiguiente procesamiento amiloidogénico de la APP (Wood et al., 2014). En este sentido, en este trabajo se encontró que el colesterol aumenta el contenido de estructuras parecidas a balsas lipídicas que fueron observadas con el marcador de GM1/CBT en cultivos primarios de astrocitos. A pesar de que ha sido reportado que la unión de CBT no es completamente específica para GM1 (Blank et al., 2007), los resultados encontrados demuestran un incremento en la señal de CBT, después de los tratamientos con colesterol, que es particularmente fuerte en aquellos sitios en los cuales también se encuentra señal con filipina que indica acumulación de colesterol. Es importante señalar que, además de inducir importantemente la formación de balsas lipídicas, el colesterol está promoviendo el aumento de GM1 en la membrana, el cual se ha observado incrementado en pacientes con EA (Svennerholm and Gottfries, 1994) y que se sabe puede estimular la producción de A β en células de neuroblastoma SH-SY5Y (Zha et al., 2004).

Por otra parte, el tratamiento con colesterol promovió la activación de los astrocitos ya que se detectó un incremento en los niveles de GFAP y, como lo que se ha reportado en neuronas (Ferrera et al., 2008; Mendoza-Oliva et al., 2013), se encontró que la exposición de los astrocitos al colesterol libre promueve un aumento en la producción de ROS y en los niveles de APP. Este aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno está asociado con el incremento de la expresión de APP inducida por el colesterol debido a que se observó que el tratamiento con el antioxidante Euk-134 lo previene. Más aún, la inhibición de la síntesis de colesterol por la lovastatina, disminuyó los niveles de la proteína APP. Otra de las proteínas que aumentaron con el tratamiento con colesterol fue la enzima BACE-1. Se ha propuesto que los ácidos grasos como el ácido palmítico y uno de sus metabolitos, la ceramida, están involucrados en la regulación de los niveles de BACE-1

y en el caso del colesterol, se ha observado que en pacientes con la enfermedad de Niemann-Pick, existe un aumento de astrocitos activados, un aumento en la producción de A β y un incremento en los niveles de BACE-1 y APP (Kodam et al., 2010). Un evento que promueve la activación de los astrocitos es el estrés oxidante, el cual se ha observado que incrementa la expresión de APP (Cheng and Trombetta, 2004; Patil et al., 2006) y los niveles de A β intracelular y secretado en células neuronales y no neuronales (Misonou et al., 2000; Atwood et al., 2003; Murray et al., 2007). Además, las ROS activan a las enzimas de la vía amiloidogénica como BACE-1 promoviendo su expresión y acelerando la producción de A β (Tamagno et al., 2002, 2003, 2005, 2008; Kao et al., 2004; Tong et al., 2005; Guglielmotto et al., 2010). Una vez activados los astrocitos, son capaces de liberar citocinas que se ha encontrado, estimulan el aumento de las proteínas de la vía amiloidogénica. Por ejemplo, se sabe que el IFN- γ promueve la expresión de BACE-1 y activa el metabolismo amiloidogénico produciendo sAPP β en células de astrocitoma U373MG y en cultivos primarios de astrocitos de ratones (Hong et al., 2003). Por otra parte, en el caso del tratamiento con ácido palmítico se sabe que se induce la liberación de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β por los astrocitos y cuando se tratan neuronas primarias corticales de rata con medio condicionado proveniente de astrocitos tratados con el ácido graso, se incrementan significativamente los niveles de BACE-1 y de A β (Patil and Chan, 2005; Patil et al., 2006, 2007; Liu et al., 2013).

De esta forma, la activación de los astrocitos por el colesterol puede llevar a la producción de ROS que *per se* promueve el aumento de la expresión de APP y posiblemente BACE-1, favoreciendo el procesamiento amiloidogénico. Asimismo, es posible que el colesterol a través de la formación de ROS, induzca el encendido de cascadas de señalización que se ha observado conducen a la liberación de citocinas como IL-1 β , TNF- α o IFN- γ que, actuando de manera autócrina o parácrina, pueden estar activando a sus receptores o receptores de otras células, y así inducir factores de transcripción que finalmente llevan a la síntesis de APP y BACE-1, y a la producción de A β (Hartlage-Rubsamen et al., 2003; Hong et al., 2003; Cho et al., 2007). Tanto la formación de ROS como la liberación de citocinas, pueden a su vez, inducir la activación de los astrocitos promoviendo un haz de retroalimentación positiva. Además, aunque no se evaluó en el trabajo, es importante mencionar que al estar induciendo la producción de

ROS, el colesterol podría estar promoviendo su propia oxidación y la producción de oxisteroles que se han visto implicados en la EA (Dias et al., 2014) y que en neuronas modulan tanto a la vía amiloidogénica como la no amiloidogénica además de la homeostasis del mismo colesterol (Bu, 2009; Prasanthi et al., 2009; Marwarha et al., 2010).

Por otro lado, como ya se mencionó, en este trabajo se observó que el colesterol promueve la formación de balsas lipídicas. El aumento de balsas lipídicas en la membrana ha sido ampliamente reportado como un factor promotor de la asociación de APP, presenilina y BACE-1, y el consecuente incremento de la producción de A β y la vía amiloidogénica en neuronas (Simons and Ikonen, 1997; Simons et al., 1998; Simons and Toomre, 2000; Ikonen, 2001; Riddell et al., 2001; Wahrle et al., 2002; Eehalt et al., 2003; Parton and Richards, 2003; Kawarabayashi et al., 2004; Vetrivel et al., 2004; Marquer et al., 2011). En modelos celulares de la enfermedad de Niemann-Pick se ha encontrado que después de la acumulación de colesterol en la célula, existe un aumento en el desplazamiento de APP/CTF hacia las balsas lipídicas incrementando el procesamiento amiloidogénico (Kosicek et al., 2010). Más aún, se ha propuesto que tanto el fragmento C-99 como la APP tienen la capacidad de unir colesterol específicamente, sugiriendo al colesterol como un factor importante en el tráfico de la APP hacia las balsas lipídicas y la modulación del corte por la β - y/o γ -secretasa. La observación de que C-99 tiene la propiedad de unir colesterol, ha hecho pensar que una de las funciones de APP es la de un sensor/receptor de colesterol que regula la toma de colesterol bajo ciertas condiciones de composición de la membrana lipídica (Beel et al., 2008). Además, se sabe que la actividad de BACE-1 es altamente sensible al ambiente lipídico y es estimulada por glucoesfingolípidos, glicerofosfolípidos y esteroides (Kalvodova et al., 2005).

De manera similar a lo descrito en neuronas, en este trabajo se encontró que el tratamiento con colesterol induce la asociación de APP con BACE-1. Esta asociación se correlaciona con un importante incremento en los fragmentos C-99 y sAPP β que derivan de la actividad de BACE-1, demostrando así la promoción del procesamiento amiloidogénico en cultivos primarios de astrocitos. Sin embargo, sólo se detectó una ligera secreción de A β 40 al medio de este tipo celular. Esta aparente discrepancia probablemente surge debido a que los astrocitos primarios poseen un sistema de captura

rápido y un mecanismo de degradación de este péptido que resulta eficiente (Nielsen et al., 2010). Los astrocitos activados pueden internalizar y degradar A β (Pihlaja et al., 2008), posiblemente en un intento por reducir la cantidad de A β disponible para las neuronas. No obstante, la exposición a A β puede tener consecuencias perjudiciales para los astrocitos ya que el péptido A β regula la secreción de citocinas e incrementa la liberación de óxido nítrico en cultivos primarios (Hu et al., 1998). Más aún, A β puede inducir la muerte de astrocitos (Nagele et al., 2003). Sin embargo, la evidencia de la acumulación de A β en la glía en la EA es controversial, ya que se ha observado su acumulación en astrocitos y microglía (Nishimura et al., 1997) o en astrocitos pero no en microglía o neuronas (Funato et al., 1998; Kurt et al., 1999). A pesar de lo anterior, estudios recientes indican que la función de limpieza de los astrocitos se puede ver comprometida en la EA (Mulder et al., 2012), y un incremento significativo de el péptido A β puede ocurrir en esta situación patológica. Por otra parte, los pequeños cambios detectados en A β 40/42 en el presente trabajo, pueden ser debidos a que los astrocitos son capaces de producir y secretar diferentes patrones de variantes del péptido A β truncado en su N-terminal que no fueron detectados en este estudio (Oberstein et al., 2014). Otra explicación posible es que el colesterol induce el aumento de la asociación de APP y BACE-1, pero no afecta la actividad de la γ -secretasa para así completar la producción de A β .

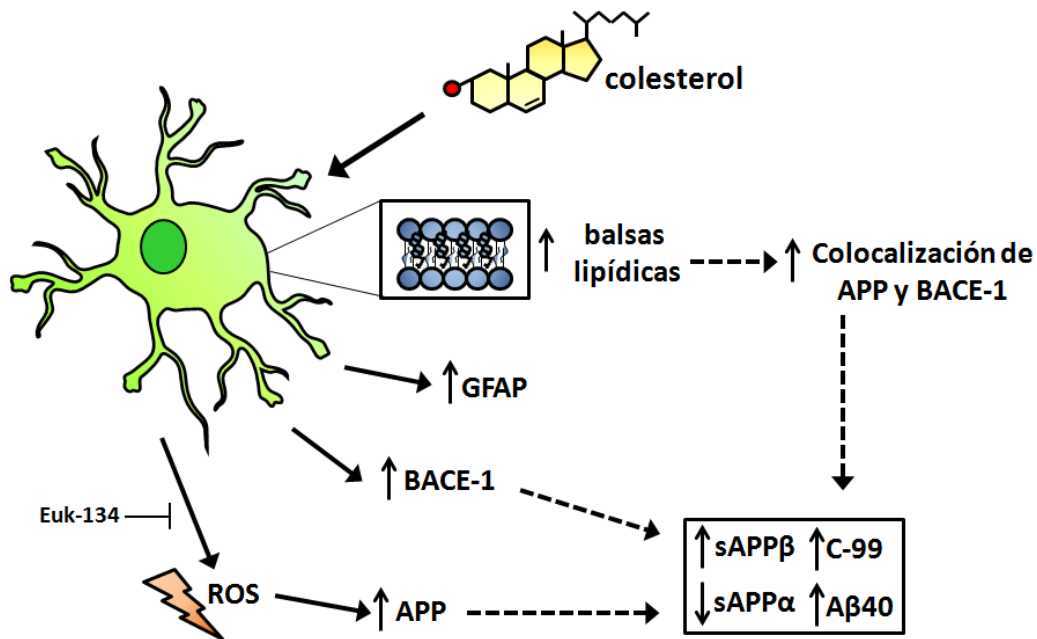
La síntesis, tráfico y procesamiento de APP es un proceso altamente complejo y regulado. De este estudio, es importante mencionar que favorecer la vía amiloidogénica puede no sólo incrementar la producción de A β , sino también reducir otros péptidos derivados del procesamiento no amiloidogénico como el sAPP α . Se sabe que el fragmento sAPP α es generado por la acción de la enzima α -secretasa que se encuentra fuera de los dominios de balsas lipídicas de la membrana de la neurona (Ridell et al., 2001). La reducción de sAPP α también tiene consecuencias patológicas en el cerebro (Kuhn et al., 2010) y en esta reducción los astrocitos son partícipes. Este fragmento soluble es importante debido a que se le han encontrado funciones neurotróficas y neuroprotectoras como la formación/mantenimiento de espinas dendríticas y la inducción de la diferenciación neural de las células madre hacia el linaje astrocítico (Baek et al., 2002; Pardossi-Piquard et al., 2005; Liu et al., 2007; Zhang et al., 2007). Además, se ha observado que puede estimular a la guanilato ciclasa unida a la membrana, regular la homeostasis del

calcio, decrementar las corrientes generadas por el receptor NMDA e incrementar la conductancia de los canales de potasio (Barger and Mattson, 1995; Barger et al. 1995).

Por otro lado, además del sAPP α , en este estudio también se encontraron alterados otros productos del procesamiento de la APP como el sAPP β , que aunque se ha asociado con efectos neuroprotectores, se ha observado que comparado con sAPP α , es cien veces menos potente en proteger a las neuronas hipocampales en contra de la excitotoxicidad, la toxicidad por A β y la privación de glucosa (Furukawa et al., 1996b). Otro fragmento que se observó aumentado de manera importante fue el C-99, el cual ha sido asociado con procesos de neurodegeneración y con la promoción de déficits cognitivos en modelos animales (Lauritzen et al., 2012; Mitani et al., 2012). La sobreexpresión de C-99 ha sido ligada con efectos citotóxicos (Yankner et al., 1989; Oster-Granite et al., 1996) y se ha observado que esta involucrada en la localización de γ -secretasa en la superficie celular (Liu et al., 2009).

De esta manera, aunque colesterol no afectó de forma importante la producción de A β , sí modificó los niveles de los fragmentos derivados del procesamiento de APP tanto de la vía no amiloidogénica como amiloidogénica, aumentando el fragmento C-99 asociado con neurodegeneración y reduciendo el fragmento sAPP α relacionado con neuroprotección. Estos eventos pueden tener efectos fisiológicos importantes que posicionan al astrocito como un elemento fundamental que contribuye en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

8. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES



- El colesterol induce la formación/aumento de balsas lipídicas, lo que incrementa la colocalización de APP con BACE-1.
- El tratamiento con colesterol promueve el aumento de la proteína GFAP lo que sugiere la activación de los astrocitos. Aunque no se determinó en este trabajo, la activación de los astrocitos podría estar dada también por la generación de ROS y/o la liberación de citocinas.
- La formación de ROS inducida por colesterol, promueve el aumento de los niveles de APP, el cual es inhibido por el antioxidante Euk-134.
- El colesterol incrementa los niveles de BACE-1, que aunque no se demostró en este trabajo, puede ser promovido por el estrés oxidante generado por el colesterol y/o por la liberación de ciertas citocinas.
- Todos estos eventos llevan a un aumento en el procesamiento amiloidogénico de la APP representado como el incremento de los fragmentos C-99, sAPPβ y Aβ40, y la disminución del procesamiento no amiloidogénico visto como el decremento en la producción del fragmento sAPPα.

En conclusión, con base en los resultados obtenidos, se propone que la acción del colesterol puede ser bidireccional: (1) cambios en los niveles de colesterol en los astrocitos

pueden inducir la activación de los astrocitos, promover el estrés oxidante y la sobreexpresión de APP y BACE-1, y (2) a través de la formación de balsas lipídicas, el colesterol puede favorecer la asociación de APP y BACE-1, resultando en la activación de la vía amiloidogénica. En ambos casos el colesterol induce la alteración de la producción de fragmentos derivados de la APP que poseen papeles fisiológicos importantes. De esta manera, los astrocitos activados por el colesterol pueden ser un factor importante que contribuye en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Es interesante que los astrocitos se encuentran en estrecho contacto con las sinapsis y vasos sanguíneos, lo que lleva a pensar que la producción local de A β y otros fragmentos por los astrocitos pueda ser tóxica para estos componentes que se sabe están fuertemente asociados en la fisiopatología de esta enfermedad.

9. PERSPECTIVAS

El presente trabajo abordó el efecto del colesterol en el procesamiento amiloidogénico en los astrocitos con miras a comprender mejor la enfermedad de Alzheimer y la contribución de los astrocitos en su desarrollo. Sin embargo, a pesar de que se encontró que el colesterol induce el aumento de proteínas importantes en la vía amiloidogénica como la APP y BACE-1, su asociación y la alteración en la producción de fragmentos derivados del corte de la APP como sAPP α , sAPP β , C-99 y A β , quedan abiertas muchas preguntas que sería interesante dilucidar:

1. *¿Cuál es el efecto de la inhibición de ROS en los niveles de BACE-1, en la asociación entre APP y esta enzima, y en la formación de los fragmentos derivados del corte de APP inducidos por el colesterol ?.*

En el presente trabajo se observó que al disminuir la producción de ROS, mediante el inhibidor Euk-134, se redujeron los niveles de APP inducidos por colesterol. Sin embargo, faltó establecer qué sucede con los niveles de BACE-1 y si la reducción de ROS tiene algún efecto en la asociación entre esta enzima y su sustrato APP, y por lo tanto en la producción de los fragmentos proteolíticos resultantes.

2. *¿Cómo es la dinámica de formación de balsas lipídicas bajo el tratamiento con colesterol en astrocitos?.*

Es importante conocer la dinámica de formación de balsas lipídicas en los astrocitos de manera fisiológica y durante el tratamiento con colesterol, ya que los astrocitos son los principales encargados de la producción de colesterol en el cerebro adulto y se ha observado que en enfermedades donde existe acumulación de colesterol en el cerebro, como la enfermedad de Niemann Pick, existe un aumento en la producción de A β .

3. *¿El colesterol induce la liberación de citocinas por los astrocitos?*

En este estudio se encontró que el colesterol induce la formación de ROS. Sin embargo, sería importante determinar si también tiene la capacidad *per se* de inducir la liberación de citocinas o si lo hace a través de la inducción del estrés oxidante. Además, ya que se ha observado que las citocinas tienen un papel importante en promover el aumento de APP y BACE-1, sería relevante conocer si también están modulando los niveles de dichas proteínas bajo el tratamiento con colesterol.

4. *¿Cómo se están afectando los productos de oxidación del colesterol en los astrocitos?*

El colesterol induce la formación de ROS, por lo tanto sería importante conocer cuál es el estado de oxisteroles 24-OH y 27-OH que se han implicado en la EA y en el aumento de las proteínas BACE-1 y APP en astrocitos.

5. *¿Cuáles vías de señalización están implicadas en los procesos observados en el trabajo?*

Otro aspecto interesante, sería conocer qué vías de señalización se activan en los astrocitos después del tratamiento con colesterol y cuáles están implicadas con el aumento de APP y BACE-1. Las vías a estudiar podrían implicar las activadas con el estrés oxidante y con las citocinas como las vías de JNK, JAK/STAT, NF κ B o MAPK.

6. *¿Cuál es el papel de los fragmentos proteolíticos de la APP en astrocitos?*

Otro aspecto que no ha sido muy estudiado en la enfermedad de Alzheimer es el papel de los fragmentos proteolíticos de la APP. La mayoría de los estudios se han centrado en el péptido A β . Sin embargo, recientemente se ha sugerido que los fragmentos C-terminales y N-terminales derivados del corte de APP por BACE-1 o α -secretasa son importantes a nivel fisiológico y podrían estar contribuyendo en el desarrollo de la enfermedad. En el presente trabajo se encontró que el colesterol

modula la producción de estos fragmentos. Sin embargo, sería importante conocer cuál es el papel fisiológico de estos fragmentos en los astrocitos y en cuanto a la vía amiloidogénica falta saber qué sucede con el fragmento AICD, que se sabe actúa como factor de transcripción de varias proteínas incluyendo APP y BACE-1.

7. *¿Qué sucede con la enzima γ -secretasa en astrocitos, al ser sometida al tratamiento con colesterol?*

Ya que los efectos del colesterol sobre la producción de A β fueron pequeños, sería importante conocer qué sucede con la actividad de γ -secretasa con el tratamiento con colesterol. Es posible que el colesterol no tenga efecto sobre esta enzima y por ende no se estén observando resultados importantes en la producción del péptido amiloide.

8. *¿Cómo se encuentra la captura de A β por los astrocitos de manera normal y bajo el tratamiento con colesterol?*

Se sabe que los astrocitos son capaces de capturar y degradar al A β , y ésta puede ser una razón por la cuál no se observaron cambios importantes en su producción. Por ello sería importante determinar cuál es la eficiencia de captura de A β por los astrocitos de manera normal y bajo el tratamiento con distintas dosis de colesterol.

9. *¿Qué sucede con el procesamiento amiloidogénico de astrocitos provenientes de modelos animales de la EA cuando son tratados con colesterol?*

En el presente trabajo se utilizaron cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas. Sin embargo, sería importante poder establecer cultivos de astrocitos provenientes de modelos animales de la enfermedad como los ratones Tg-2576, 3xTg-AD, 5xFAD o los EFAD, para conocer qué sucede con el procesamiento amiloidogénico cuando son tratados con colesterol y si es que se modifica la aparición de los marcadores de la enfermedad.

10. REFERENCIAS

Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **7**:41-53.

Abd El Mohsen, M.M., Iravani, M.M., Spencer, J.P., Rose, S., Fahim, A.T., Motawi, T.M., Ismail, N.A., Jenner, P. (2005). Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun.* **336**:386-91.

Ahn, K., Shelton, C.C., Tian, Y., Zhang, X., Gilchrist, M.L., Sisodia, S.S., Li, Y.M. (2010). Activation and intrinsic {gamma}-secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**:21435-40.

Akassoglou, K., Probert, L., Kontogeorgos, G., Kollias, G. (1997). Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol.* **158**:438-45.

Allen, N.J., Barres, B.A. (2009). Neuroscience: glia—more than just brain glue. *Nature.* **457**:675-7.

Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Robin, M.A., Avadhani, N.G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol.* **161**:41-54.

Anderson, M.A., Ao, Y., Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett.* **565**:23-9.

Angelova, P.R., Abramov, A.Y. (2014). Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of A β -induced neurotoxicity. *Biochem Soc Trans.* **42**:1286-90.

- Anliker, B., Müller, U.** (2006). The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis.* **3**:239-46.
- Ansari, M.A., Scheff, S.W.** (2010). Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol.* **69**:155-67.
- Arendt, T., Brückner, M.K., Morawski, M., Jäger, C., Gertz, H.J.** (2015). Early neurone loss in Alzheimer's disease: cortical or subcortical?. *Acta Neuropathol Commun.* **3**:10.
- Ariga, T., Kobayashi, K., Hasegawa, A., Kiso, M., Ishida, H., Miyatake, T.** (2001). Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid beta-protein. *Arch Biochem Biophys.* **388**:225-30.
- Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A., Martins, R.N.** (2003). Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev.* **43**:1-16.
- Avila-Muñoz, E., Arias, C.** (2014). When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* **18**:29-40.
- Aydin, D., Weyer, S.W., Müller, U.C.** (2012). Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models. *Exp Brain Res.* **217**:423-34.
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. P. E., Filho, W. J., Lent, R., Herculano-Houzel, S.** (2009). Equal number of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol.* **513**: 532-41.
- Bachman, D.L., Wolf, P.A., Linn, R.T., Knoefel, J.E., Cobb, J.L., Belanger, A.J., White, L.R., D'Agostino, R.B.** (1993). Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: the Framingham Study. *Neurology.* **43**:515-9.
- Bachoo, R.M., Kim, R.S., Ligon, K.L., Maher, E.A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S., Li, C., Rowitch, D.H., Wong, W.H., DePinho, R.A.** (2004). Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:8384-9.
- Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D. W., Koo, E.H., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.** (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell.* **110**:55-67.
- Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M.** (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* **16**:1-13.
- Bardehle, S., Krüger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., Dimou, L., Götz, M.** (2013). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci.* **16**:580-6.

- Barger, S.W., Fiscus, R.R., Ruth, P., Hofmann, F., Mattson, M.P.** (1995). Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of beta-amyloid precursor. *J Neurochem.* **64**:2087-96.
- Barger, S.W., Harmon, A.D.** (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature.* **388**:878-81.
- Barger, S.W., Mattson, M.P.** (1995). The secreted form of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein stimulates a membrane-associated guanylate cyclase. *Biochem J.* **311**:45-7.
- Barja, G.** (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* **27**:595-600.
- Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F.W., Meletis, K., Frisén, J.** (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell.* **7**:470-82.
- Barrett, P.J., Song, Y., Van Horn, W.D., Hustedt, E.J., Schafer, J.M., Hadziselimovic, A., Beel, A.J., Sanders, C.R.** (2012). The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science.* **336**:1168-71.
- Bass, N. H., Hess, H. H., Pope, A., Thalheimer, C.** (1971). Quantitative cytoarchitectonic distribution of neurons, glia, and DNA in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol.* **143**:481-90.
- Beel, A.J., Mobley, C.K., Kim, H.J., Tian, F., Hadziselimovic, A., Jap, B., Prestegard, J.H., Sanders, C.R.** (2008). Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor?. *Biochemistry.* **47**:9428-46.
- Behr, D., Hesse, L., Masters, C.L., Multhaup, G.** (1996). Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem.* **271**:1613-20.
- Belyaev, N.D., Kellett, K.A., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M., Turner, A.J.** (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem.* **285**:41443-54.
- Benjannet, S., Elagoz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J.S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J.A., Sisodia, S., Checler, F., Chrétien, M., Seidah, N.G.** (2001). Post-translational processing of β -secretase (β -amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid- β production. *J Biol Chem.* **276**:10879-87.
- Ben Khalifa, N., Tyteca, D., Courttoy, P.J., Renauld, J.C., Constantinescu, S.N., Octave, J.N., Kienlen-Campard, P.** (2012). Contribution of Kunitz protease inhibitor and transmembrane domains to amyloid precursor protein homodimerization. *Neurodegener Dis.* **10**:92-5.
- Benner, E.J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D.S., Liu, C., Eroglu, C., Kuo, C.T.** (2013). Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature.* **497**:369-73.

- Bettegazzi, B., Mihailovich, M., Di Cesare, A., Consonni, A., Macco, R., Pelizzoni, I., Codazzi, F., Grohovaz, F., Zacchetti, D.** (2011). β -secretase activity in rat astrocytes: translational block of BACE1 and modulation of BACE2 expression. *Europ. J. Neurosci.* **33**:236-43.
- Bigl, M., Apelt, J., Lushekina, E.A., Lange-Dohna, C., Roßner, S.S.** (2000). Expression of beta-secretase mRNA in transgenic Tg2576 mouse brain with Alzheimer plaque pathology. *Neurosci. Lett.* **292**:107-10.
- Björkhem, I.** (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med.* **260**:493-508.
- Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., Meaney, S.** (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med.* **30**:171-9.
- Black, R.A., White, J.M.** (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol.* **10**:654-9.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stockin, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., Cerretti, D.P.** (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* **385**:729-33.
- Blank, N., Schiller, M., Krienke, S., Wabnitz, G., Ho, A.D., Lorenz, H.M.** (2007). Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol Cell Biol.* **85**:378-82.
- Blasko, I., Beer, R., Bigl, M., Apelt, J., Franz, G., Rudzki, D., Ransmayr, G., Kampfl, A., Schliebs, R.** (2004). Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease beta-secretase (BACE-1). *J Neural Transm.* **111**:523-36.
- Blobel, C.P.** (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**:32-43.
- Block, M.L., Zecca, L., Hong, J.S.** (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* **8**:57-69.
- Bonda, D.J., Wang, X., Perry, G., Nunomura, A., Tabaton, M., Zhu, X., Smith, M.A.** (2010). Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology.* **59**:290-4.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G., Sisodia, S.S.** (1996) Familial Alzheimer's diseaselinked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron.* **17**:1005-13.
- Borghi, R., Patriarca, S., Traverso, N., Piccini, A., Storace, D., Garuti, A., Cirmena G., Odetti, P., Tabaton, M.** (2007). The increased activity of BACE1 correlates with oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **28**:1009-14.

- Börnig, H., Geyer, G.** (1974). Staining of cholesterol with the fluorescent antibiotic "filipin". *Acta Histochem.* **50**:110-5.
- Borrell-Pagès, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J., Arribas, J.** (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J.* **22**:1114-24.
- Brenner, M., Johnson, A.B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J.E., Messing, A.** (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet.* **27**:117-20.
- Bretillon, L., Sidén, A., Wahlund, L.O., Lütjohann, D., Minthon, L., Crisby, M., Hillert, J., Groth, C.G., Diczfalusy, U., Björkhem, I.** (2000). Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett.* **293**:87-90.
- Brosig, B., Langosch, D.** (1998). The dimerization motif of the glycophorin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Sci.* **7**:1052-6.
- Brown, A.M., Ransom, B.R.** (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia.* **55**:1263-71.
- Brown, D.A., London, E.** (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:111-36.
- Bu, G.** (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.* **10**:333-44.
- Bu, G., Cam, J., Zerbinatti, C.** (2006). LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* **1086**:35-53.
- Burns, M.P., Noble, W.J., Olm, V., Gaynor, K., Casey, E., LaFrancois, J., Wang, L., Duff, K.** (2003). Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar A β in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res.* **110**:119-25.
- Burton, T., Liang, B., Dibrov, A., Amaraa, F.** (2002). Transcriptional activation and increase in expression of Alzheimer's b-amyloid precursor protein gene is mediated by TGF- β in normal human astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **295**:702-12.
- Busciglio, J., Gabuzada, A.H., Matsudaira, P., Yankner, B.A.** (1993). Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci.* **90**:2092-6.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Ellisman, M.H.** (2004). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci.* **22**:73-86.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H.** (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* **22**:183-92.

Cáceres, J., Brandan, E. (1997). Interaction between Alzheimer's disease beta A4 precursor protein (APP) and the extracellular matrix: evidence for the participation of heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biochem.* **65**:145-58.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., Barres, B.A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* **28**:264-78.

Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* **131**:2173-81.

Cajal, R.S.Y. (1995). Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates. *Oxford University Press, New York.*

Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., Haass, C. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of b-secretase. *J Biol Chem.* **275**:30849-54.

Carter, D.B., Dunn, E., McKinley, D.D., Stratman, N.C., Boyle, T.P., Kuiper, S.L., Oostveen, J.A., Weaver, R.J., Boller, J.A., Gurney, M.E. (2001). Human apolipoprotein E4 accelerates beta-amyloid deposition in APPsw transgenic mouse brain. *Ann Neurol.* **50**:468-75.

Chan-Ling, T., Stone, J. (1991). Factors determining the migration of astrocytes into the developing retina: migration does not depend on intact axons or patent vessels. *J Comp Neurol.* **303**:375-86.

Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R., Sanderson, M. J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* **6**:983-92.

Chasseigneaux, S., Allinquant, B. (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem.* **1**:99-108.

Chasseigneaux, S., Dinc, L., Rose, C., Chabret, C., Culpier, F., Topilko, P., Mauger, G., Allinquant, B. (2011). Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One.* **6**:e16301.

Checler, F., Sunyach, C., Pardossi-Piquard, R., Sevalle, J., Vincent, B., Kawarai, T., Girardot, N., St George-Hyslop, P., da Costa, C.A. (2007). The gamma/epsilon-secretase-derived APP intracellular domain fragments regulate p53. *Curr Alzheimer Res.* **4**:423-6.

Cheng, S.Y., Trombetta, L.D. (2004). The induction of amyloid precursor protein and alpha-synuclein in rat hippocampal astrocytes by diethyldithiocarbamate and copper with or without glutathione. *Toxicol Lett.* **146**:139-49.

Cheng, G., Yu, Z., Zhou, D., Mattson, M.P. (2002). Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Exp Neurol.* **175**:407-14.

Cho, H.J., Kim, S-K., Jin, S.M., Hwang, E-M., Kim, Y.S., Huh, K., Mook-Jung, I. (2007). IFN- γ -induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes. *GLIA*. **55**:253-62.

Cho, R.W., Park, J.M., Wolff, S.B., Xu, D., Hopf, C., Kim, J.A., Reddy, R.C., Petralia, R.S., Perin, M.S., Linden, D.J., Worley, P.F. (2008). mGluR1/5-dependent long-term depression requires the regulated ectodomain cleavage of neuronal pentraxin NPR by TACE. *Neuron*. **57**:858-71.

Clifford, P.M., Zarrabi, S., Siu, G., Kinsler, K.J., Kosciuk, M.C., Venkataraman, V., D'Andrea, M.R., Dinsmore, S., Nagele, R.G. (2007). Abeta peptides can enter the brain through a defective blood-brain barrier and bind selectively to neurons. *Brain Res*. **1142**:223-36.

Choo-Smith, L.P., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G., Surewicz, W.K. (1997). Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Abeta-(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J Biol Chem*. **272**:22987-90.

Coburger, I., Hoefgen, S., Than, M.E. (2014). The structural biology of the amyloid precursor protein APP - a complex puzzle reveals its multi-domain architecture. *Biol Chem*. **395**:485-98.

Collin, R.W., van Strien, D., Leunissen, J.A., Martens, G.J. (2004). Identification and expression of the first nonmammalian amyloid-beta precursor-like protein APLP2 in the amphibian *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem*. **271**:1906-12.

Colombo, J.A., Reisin, H.D. (2004). Interlaminar astroglia of the cerebral cortex: a marker of the primate brain. *Brain Res*. **1006**:126-31.

Costantini, C., Ko, M.H., Jonas, M.C., Puglielli, L. (2007). A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J*. **407**:383-95.

Cupers, P., Bentahir, M., Craessaerts, K., Orlans, I., Vanderstichele, H., Saftig, P., De Strooper, B., Annaert, W. (2001). The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol*. **154**:731-40.

Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, M.P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**:2070-5.

Dal Prà, I., Whitfield, J.F., Pacchiana, R., Bonafini, C., Talacchi, A., Chakravarthy, B., Armato, U., Chiarini, A. (2011). The amyloid- β_{42} proxy, amyloid- $\beta(25-35)$, induces normal human cerebral astrocytes to produce amyloid- β_{42} . *J Alzheimers Dis*. **24**:335-47.

Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H., Sirinathsinghji, D.J. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*. **90**:1-13.

De Strooper, B., Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*. **113**: 1857-70.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. **391**:387-90.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Schrijvers, V., Wolfe, M.S., Ray, W.J., Goate, A., Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. **398**:518-22.

Dias, I.H., Polidori, M.C., Griffiths, H.R. (2014). Hypercholesterolaemia-induced oxidative stress at the blood-brain barrier. *Biochem Soc Trans*. **42**:1001-5.

Diehlmann, A., Ida, N., Weggen, S., Grunberg, J., Haass, C., Masters, C. L., Bayer, T. A., and Beyreuther, K. (1999). Analysis of Presenilin 1 and Presenilin 2 Expression and Processing by Newly Developed Monoclonal Antibodies. *J Neurosci Res*. **56**:405-19.

Dietschy, J.M., Turley, S.D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*. **12**:105-12.

Dietschy, J.M., Turley, S.D. (2004). Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*. **45**:1375-97.

Dolganiuc, A. (2011). Role of lipid rafts in liver health and disease. *World J Gastroenterol*. **17**:2520-35.

Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., Yan, S.S. (2010). Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107**:18670-5.

Edwards, D.R., Handsley, M.M., Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*. **29**:258-89.

Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol*. **160**:113-23.

Esselens, C., Oorschot, V., Baert, V., Raemaekers, T., Spittaels, K., Serneels, L., Zheng, H., Saftig, P., De Strooper, B., Klumperman, J., Annaert, W. (2004). Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway. *J Cell Biol*. **166**:1041-54.

Evans, R.M., Hui, S., Perkins, A., Lahiri, D.K., Poirier, J., Farlow, M.R. (2004). Cholesterol and APOE genotype interact to influence Alzheimer disease progression. *Neurology*. **62**:1869-71.

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., Hartmann, T. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**:5856-61.

- Fawcett, J.W., Asher, R.A.** (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* **49**:377-91.
- Ferrera, P., Mercado-Gómez, O., Silva-Aguilar, M., Valverde, M., Arias, C.** (2008). Cholesterol potentiates b-amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: Involvement of oxidative stress. *Neurochem Res.* **33**:1509-17.
- Floyd, R.A.** (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* **222**:236-45.
- Freude, K.K., Penjwini, M., Davis, J.L., LaFerla, F.M., Blurton-Jones, M.** (2011). Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem.* **286**:24264-74.
- Friedrich, R.P., Tepper, K., Ronicke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C., Fandrich, M.** (2010). Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**:1942-7.
- 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**:1381-9.
- Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T.C., Ito, Y., Yokofujita, J., Okeda, R., Ihara, Y.** (1998). Astrocytes containing amyloid beta-protein (Abeta)-positive granules are associated with Abeta40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am J Pathol.* **152**:983-92.
- Furukawa, K., Barger, S.W., Blalock, E.M., Mattson, M.P.** (1996a). Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid precursor protein. *Nature.* **379**:74-8.
- Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., Mattson, M.P.** (1996b). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem.* **67**:1882-96.
- Galbete, J.L., Martin, T.R., Peressini, E., Modena, P., Bianchi, R., Forloni, G.** (2000). Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem J.* **348**:307-13.
- Gamba, P., Leonarduzzi, G., Tamagno, E., Guglielmotto, M., Testa, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Biasi, F., Mauro, A., Viña, J., Poli, G.** (2011). Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell.* **10**:403-17.
- Gandy, S.** (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* **115**:1121-9.
- Garton, K.J., Gough, P.J., Philalay, J., Wille, P.T., Blobel, C.P., Whitehead, R.H., Dempsey, P.J., Raines, E.W.** (2003). Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem.* **278**:37459-64.

- Geekiyanaige, H., Chan, C.** (2011). MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid β , novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **31**:14820-30.
- Giri, R., Shen, Y., Stins, M., Du Yan, S., Schmidt, A.M., Stern, D., Kim, K.S., Zlokovic, B., Kalra, V.K.** (2000). beta-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* **279**:1772-81.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H.** (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* **140**:918-34.
- Goddard, D.R., Bunning, R.A., Woodroffe, M.N.** (2001). Astrocyte and endothelial cell expression of ADAM 17 (TACE) in adult human CNS. *Glia.* **34**:267-71.
- Golub, T., Wacha, S., Caroni, P.** (2004). Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol.* **14**:542-50.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.** (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods.* **65**:45-80.
- Gong, Y.S., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L.** (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**:10417-22.
- Goos, M.** (2010). ADAM-17: The Enzyme That Does It All. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **45**:146-69.
- Gordon, G.R., Mulligan, S.J., MacVicar, B.A.** (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia.* **55**:1214-21.
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P., Xu, H.** (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:742-7.
- Griffin, W.S.T., Sheng, J.G., Roberts, G.W., Mrak, R.E.** (1995). Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. *J Neuropathol Exp Neurol.* **54**:276-81.
- Grimm, M.O., Grosgen, S., Rothhaar, T.L., Burg, V.K., Hundsdorfer, B., Hauptenthal, V.J., Friess, P., Muller, U., Fassbender, K., Riemenschneider, M., Grimm, H.S., Hartmann, T.** (2011). Intracellular APP domain regulates serine-Palmitoyl-CoA transferase expression and is affected in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* **2011**:695413.
- Grimm, M.O., Rothhaar, T.L., Hartmann, T.** (2012). The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism. *Exp Brain Res.* **217**:365-75.
- Guglielmotto, M., Giliberto, L., Tamagno, E., Tabaton, M.** (2010). Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci.* **2**:3.

- Guo, Q., Wang, Z., Li, H., Wiese, M., Zheng, H.** (2012). APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell Res.* **22**:78-89.
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., Bruce-Keller, A.J.** (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem.* **120**:1060-71.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.H., Haydon, P.G.** (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci.* **27**:6473-7.
- Hamby, M.E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D.H., Khakh, B.S., Sofroniew, M.V.** (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *J Neurosci.* **32**:14489-510.
- Haniu, M., Denis, P., Young, Y., Mendiaz, E.A., Fuller, J., Hui, J.O., Bennett, B.D., Kahn, S., Ross, S., Burgess, T., Katta, V., Rogers, G., Vassar, R., Citron, M.** (2000). Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem.* **275**:21099-106.
- Harada, H., Tamaoka, A., Ishii, K., Shoji, S., Kametaka, S., Kametani, F., Saito, Y., Murayama, S.** (2006). Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Res.* **54**:24-29.
- Hardy, J.** (1997). The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:2095-7.
- Hardy, J., Selkoe, D. J.** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* **297**:353-6.
- Harman, D.** (1992). Free radical theory of aging. *Mutat Res.* **275**:257-66.
- Hartlage-Rubsamen, M., Zeitschel, U., Apelt, J., Gartner, U., Franke, H., Stahl, T., Gunther, A., Schliebs, R., Penkowa, M., Bigl, V., RoBner, S.** (2003). Astrocytic Expression of the Alzheimer's Disease β -Secretase (BACE1) Is Stimulus-Dependent. *Glia.* **41**:169-79.
- Hascalovici, J.R., Vaya, J., Khatib, S., Holcroft, C.A., Zukor, H., Song, W., Arvanitakis, Z., Bennett, D.A., Schipper, H.M.** (2009). Brain sterol dysregulation in sporadic AD and MCI: relationship to heme oxygenase-1. *J Neurochem.* **110**:1241-53.
- Hasebe, N., Fujita, Y., Ueno, M., Yoshimura, K., Fujino, Y., Yamashita, T.** (2013). Soluble β -amyloid Precursor Protein Alpha binds to p75 neurotrophin receptor to promote neurite outgrowth. *PLoS ONE.* **8**:e82321.
- Hayashi, H., Kimura, N., Yamaguchi, H., Hasegawa, K., Yokoseki, T., Shibata, M., Yamamoto, N., Michikawa, M., Yoshikawa, Y., Terao, K., Matsuzaki, K., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Naiki, H., Yanagisawa, K.** (2004). A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci.* **24**:4894-902.
- He, X., Jenner, A.M., Ong, W.Y., Farooqui, A.A., Patel, S.C.** (2006). Lovastatin modulates increased cholesterol and oxysterol levels and has a neuroprotective effect on rat hippocampal neurons after kainite injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* **65**:652-63.

Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H.P., Wolfner, D.P., Müller, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci.* **20**:7951-63.

Helms, J.B., Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic.* **5**:247-54.

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia.* **62**:1377-91.

Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalusy, U., Winblad, B., Björkhem, I. (2004). Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* **45**:186-93.

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**:783-6.

Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., Paul, S.M. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:2892-7.

Hong, H.S., Hwang, E.M., Sim, H.J., Cho, J-H., Boo, J.H., Oh, S.S. (2003). Interferon γ stimulates β -secretase expression and sAPP β production in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **307**:922-7.

Hu, J., Akama, K.T., Krafft, G.A., Chromy, B.A., and van Eldik, L.J. (1998). Amyloid- β peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Research.* **785**:195-206.

Huse, J.T., Pijak, D.S., Leslie, G.J., Lee, V.M., Doms, R.W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* **275**:33729-37.

Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C., Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci.* **14**:419-27.

Iadecola, C., Nedergaard, M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* **10**:1369-76.

Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* **13**:470-7.

Iwatsubo, T. (2004). The γ -secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol.* **14**:379-83.

Ji, Z.S., Miranda, R.D., Newhouse, Y.M., Weisgraber, K.H., Huang, Y., Mahley, R.W. (2002). Apolipoprotein E4 potentiates amyloid beta peptide-induced lysosomal leakage and apoptosis in neuronal cells. *J Biol Chem.* **277**:21821-8.

Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A. (2000). Statins and the risk of dementia. *Lancet.* **356**:1627-31.

Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y.J., Chun, Y.E., Park, M., Woo, D.H., Bae, J.Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., Park, H.J., Lee da, Y., Hong, J., Kim, H.Y., Oh, S.J., Park, S.J., Lee, H., Yoon, B.E., Kim, Y., Jeong, Y., Shim, I., Bae, Y.C., Cho, J., Kowall, N.W., Ryu, H., Hwang, E., Kim, D., Lee, C.J. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* **20**:886-96.

Joshi, Y.B., Praticò, D. (2015). The 5-lipoxygenase pathway: oxidative and inflammatory contributions to the Alzheimer's disease phenotype. *Front Cell Neurosci.* **8**:436.

Jucker, M., Walker, L.C. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature.* **501**:45-51.

Kalvodova, L., Kahya, N., Schwille, P., Ehehalt, R., Verkade, P., Drechsel, D., Simons, K. (2005). Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J Biol Chem.* **280**:36815-23.

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron.* **37**:925-37.

Kamiguchi, H. (2006). The region-specific activities of lipid rafts during axon growth and guidance. *J Neurochem.* **98**:330-5.

Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J.A., Jansen, A.H., Verveer, M., de Groot, L.R., Smith, V.D., Rangarajan, S., Rodríguez, J.J., Orre, M., Hol, E.M. (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One.* **7**:e42823.

Kao, S.C., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S., Tsai, L.H. (2004). BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons. *J Biol Chem.* **279**:1942-9.

Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L.H., Wen-Lang, L., Dickson, D.W., Murakami, T., Matsubara, E., Abe, K., Ashe, K.H., Younkin, S.G. (2004). Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **24**:3801-9.

Keller, J.N., Mattson, M.P. (1998). Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction, and death in the nervous system. *Rev Neurosci.* **9**:105-16.

Kenworthy, A.K., Petranova, N., Edidin, M. (2000). High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell.* **11**:1645-55.

- Kern, A., Behl, C.** (2009). The unsolved relationship of brain aging and lateonset Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta*. **1790**:1124-32.
- Khakh, B.S., Sofroniew, M.V.** (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*. **18**:942-52.
- Kierdorf, K., Wang, Y., Neumann, H.** (2010). Immune-mediated CNS damage. *Results Probl Cell Differ*. **51**:173-96
- Kim, H.S., Kim, E.M., Lee, J.P., Park, C.H., Kim, S., Seo, J.H., Chang, K.A., Yu, E., Jeong, S.J., Chong, Y.H., Suh, Y.H.** (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 β expression. *FASEB J*. **17**:1951-3.
- Kim, J., Basak, J.M., Holtzman, D.M.** (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. **63**:287-303.
- Kim, J.H., Jittiwat, J., Ong, W.Y., Farooqui, A.A., Jenner, A.M.** (2010). Changes in cholesterol biosynthetic and transport pathways after excitotoxicity. *J Neurochem*. **112**:34-41.
- Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J.** (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**:6382-7.
- King, G.D., Scott Turner, R.** (2004). Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and Alzheimer's disease risk?. *Exp Neurol*. **185**:208-19.
- Kinoshita, A., Whelan, C.M., Berezovska, O., Hyman, B.T.** (2002). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem*. **277**:28530-6.
- Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., Hashimoto, Y.** (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**:13554-9.
- Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., Nissinen, A.** (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj*. **322**:1447-51.
- 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**:380-5.
- Ko, M.H., Puglielli, L.** (2009). Two endoplasmic reticulum (ER)/ER Golgi intermediate compartment-based lysine acetyltransferases post-translationally regulate BACE1 levels. *J Biol Chem*. **284**:2482-92.
- Koehler, R.C., Roman, R.J., Harder, D.R.** (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*. **32**:160-9.

Kodam, A., Maulik, M., Peake, K., Amritraj, A., Vetrivel, K.S., Thinakaran, G., Vance, J.E., Kar, S. (2010). Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia*. **58**:1267-81.

Kölsch, H., Heun, R., Kerksiek, A., Bergmann, K.V., Maier, W., Lütjohann, D. (2004). Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. *Neurosci Lett*. **368**:303-8.

Koo, E.H., Squazzo, S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*. **269**:17386-9.

Koo, E.H., Sisodia, S.S., Archer, D.R., Martin, L.J., Weidemann, A., Beyreuther, K., Fischer, P., Masters, C.L., Price, D.L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci*. **87**:1561-5.

Kosicek, M., Malnar, M., Goate, A., Hecimovic, S. (2010). Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun*. **393**:404-9.

Kovacs, D.M., Fausett, H.J., Page, K.J., Kim, T.W., Moir, R.D., Merriam, D.E., Hollister, R.D., Hallmark, O.G., Mancini, R., Felsenstein, K.M., Hyman, B.T., Tanzi, R.E., Wasco, W. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med*. **2**:224-9.

Kuhn, P.H., Marjaux, E., Imhof, A., De Strooper, B., Haass, C., Lichtenthaler, S.F. (2007). Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem*. **282**:11982-95.

Kuhn, P.H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Rossner, S., Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive a-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. **29**:3020-32.

Kuo, Y.M., Emmerling, M.R., Bisgaier, C.L., Essenburg, A.D., Lampert, H.C., Drumm, D., Roher, A.E. (1998). Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun*. **252**:711-5.

Kurt, M.A., Davies, D.C., Kidd, M. (1999). beta-Amyloid immunoreactivity in astrocytes in Alzheimer's disease brain biopsies: an electron microscope study. *Exp Neurol*. **158**:221-8.

Kwak, Y.D., Brannen, C.L., Qu, T., Kim, H. M., Dong, X., Soba, P., Majumdar, A., Kaplan, A., Beyreuther, K., Sugaya, K. (2006). Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells Dev*. **15**:381-9.

Lacor, P.N., Buniel, M.C., Chang, L., Fernandez, S.J., Gong, Y.S., Viola, K.L., Lambert, M.P., Velasco, P.T., Bigio, E.H., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*. **24**:10191-200.

Laird, F.M., Cai, H., Savonenko, A.V., Farah, M.H., He, K., Melnikova, T., Wen, H., Chiang, H.C., Xu, G., Koliatsos, V.E., Borchelt, D.R., Price, D.L., Lee, H.K., Wong, P.C. (2005). BACE1, a major

determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci.* **25**:11693-709.

Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A beta(1-42) are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:6448-53.

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 U S A.* **96**:3922-7.

Lau, K.F., McLoughlin, D.M., Standen, C., Miller, C.C. (2000). X11 alpha and x11 beta interact with presenilin-1 via their PDZ domains. *Mol Cell Neurosci.* **16**:557-65.

Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J.D., Ranaldi, S., Fraser, P., St-George-Hyslop, P., Le Thuc, O., Espin, V., Cham, L., Dunys, J., Checler, F. (2012). The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci.* **32**:16243-55a.

Lee, M.-S., Kao, S.-C., Lemere, C.A., Xia, W., Tseng, H.-C., Zhou, Y., Neve, R., Ahlijanian, M.K., Tsai, L.-H. (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J Cell Biol.* **163**:83-95

Lee, K.J., Moussa, C.E.H., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B.W., Turner, R.S., Pak, D.T.S., Hoe, H.S. (2010). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience.* **169**:344-56.

Leissring, M.A., Murphy, M.P., Mead, T.R., Akbari, Y., Sugarman, M.C., Jannatipour, M., Anliker, B., Muller, U., Saftig, P., De Strooper, B., Wolfe, M.S., Golde, T.E., LaFerla, F.M. (2002). A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**:4697-702.

Leuba G., Garey, L.J. (1989). Comparison of neuronal and glial numerical density in primary and secondary visual cortex of man. *Exp Brain Res.* **77**:31-8.

Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T., Luyendijk, W., Frangione, B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science.* **248**:1124-6.

Li, C., Zhao, R., Gao, K., Wei, Z., Yin, M.Y., Lau, L.T., Chui, D., Hoi Yu, A.C. (2011). Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **8**:67-80.

Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.G., Ghanbari, H.A. (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci.* **14**:24438-75.

Li, Q., Sudhof, T.C. (2004). Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. *J Biol Chem.* **279**:10542-50.

- Li, R., Lindholm, K., Yang, L.B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D., Shen, Y.** (2004). Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**:3632-7.
- Li, Y.M., Lai, M.T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M.K., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A., Gardell, S.J.** (2000). Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:6138-43.
- Liu, L., Martin, R., Kohler, G., Chan, C.** (2013). Palmitate induces transcriptional regulation of BACE1 and presenilin by STAT3 in neurons mediated by astrocytes. *Exp Neurol*. **248**:482-90.
- Liu, Y., Zhang, Y.W., Wang, X., Zhang, H., You, X., Liao, F.F., Xu, H.** (2009). Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1. *J Biol Chem*. **284**:12145-52.
- Liu, Q., Zerbinatti, C. V., Zhang, J., Hoe, H. S., Wang, B., Cole, S. L., Herz, J., Muglia, L., Bu, G.** (2007). Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron*. **56**:66-78.
- Löffler, J., Huber, G.** (1992). Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J Neurochem*. **59**:1316-24.
- Lucero, H.A., Robbins, P.W.** (2004). Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys*. **426**:208-24.
- Luchsinger, J.A., Mayeux, R.** (2004). Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. **3**:579-87.
- Ludwin, S.K., Kosek, J.C., Eng, L.F.** (1976). The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol*. **165**:197-207.
- Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J.** (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. **155**:853-62.
- Luo, W.J., Wang, H., Li, H., Kim, B.S., Shah, S., Lee, H.J., Thinakaran, G., Kim, T.W., Yu, G., Xu, H.** (2003). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem*. **278**:7850-4.
- Luque-Contreras, D., Carvajal, K., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Campos-Peña, V.** (2014). Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease?. *Oxid Med Cell Longev*. **2014**:497802.
- Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R.D., Schlegel, U., Jessen, F., Rao, M.L., von Bergmann, K., Heun, R.** (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res*. **41**:195-8.

- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H.** (2006). Mitochondria are a direct site of Ab accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet.* **15**:1437-49.
- Mansour, H., Asher, R., Dahl, D., Labkovsky, B., Perides, G., Bignami, A.** (1990). Permissive and non-permissive reactive astrocytes: immunofluorescence study with antibodies to the glial hyaluronatebinding protein. *J Neurosci Res.* **25**:300-11.
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P., Reiss, K.** (2005). L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol.* **25**:9040-53.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P.** (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **827**:65-75.
- Markesbery, W.R.** (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* **23**:134-47.
- Marquer, C., Devauges, V., Cossec J-C., Liot, G., Lécart, S., Saudou, F., Duyckaerts, C., Lévêque-Fort, S., Potier, M-C.** (2011). Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J.* **25**:1295-305.
- Marquer, C., Devauges, V., Cossec, J.C., Liot, G., Lécart, S., Saudou, F., Duyckaerts, C., Lévêque-Fort, S., Potier, M.C.** (2011). Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J.* **25**:1295-305.
- Martins, I.J., Berger, T., Sharman, M.J., Verdile, G., Fuller, S.J., Martins, R.N.** (2009). Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **111**:1275-308.
- Marwarha, G., Dasari, B., Prasanthi, J.R., Schommer, J., Ghribi, O.** (2010). Leptin reduces the accumulation of Abeta and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *J Alzheimers Dis.* **19**:1007-19.
- Matsumura, A., Emoto, M.C., Suzuki, S., Iwahara, N., Hisahara, S., Kawamata, J., Suzuki, H., Yamauchi, A., Sato-Akaba, H., Fujii, H.G., Shimohama, S.** (2015). Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med.* **85**:165-73.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., Rydel, R.E.** (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron.* **10**:243-54.
- Mayeux, R.** (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.* **26**:81-104.
- Mazzetti, A.P., Fiorile, M.C., Primavera, A., LoBello, M.** (2015). Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int.* **82**:10-8.

McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **46**:860-6.

Meaney, S., Heverin, M., Panzenboeck, U., Ekström, L., Axelsson, M., Andersson, U., Diczfalusy, U., Pikuleva, I., Wahren, J., Sattler, W., Björkhem, I. (2007). Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7alpha-hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid. *J Lipid Res.* **48**:944-51.

Mendoza-Oliva, A., Ferrera, P., Arias C. (2013). Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid-b toxicity in human neuroblastoma cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **12**:842-8.

Mendoza-Oliva, A., Ferrera, P., Fragoso-Medina, J., Arias, C. (2015). Lovastatin Differentially Affects Neuronal Cholesterol and Amyloid- β Production in vivo and in vitro. *CNS Neurosci Ther.* **21**:631-41.

Meziane, H., Dodart, J.C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S.M., Ungerer, A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:12683-8.

Miake, H., Tsuchiya, K., Nakamura, A., Ikeda, K., Levesque, L., Fraser, P.E., St.-George Hyslop, P.H., Mzusa, H., Uchihara, T. (1999). Glial expression of presenilin epitopes in human brain with cerebral infarction and in astrocytoma. *Acta Neuropathol.* **98**:337-40.

Mielke, M.M., Lyketsos, C.G. (2006). Lipids and the pathogenesis of Alzheimer's disease: is there a link?. *Int Rev Psychiatry.* **18**:173-86.

Milward, E.A., Papadopoulos, R., Fuller, S.J., Moir, R.D., Small, D., Beyreuther, K., Masters, C.L. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron.* **9**:129-37.

Minopoli, G., Stante, M., Napolitano, F., Telesse, F., Aloia, L., De Felice, M., Di Lauro, R., Pacelli, R., Brunetti, A., Zambrano, N., Russo, T. (2007). Essential roles for Fe65, Alzheimer amyloid precursor-binding protein, in the cellular response to DNA damage. *J Biol Chem.* **282**:831-5.

Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., Ihara, Y. (2000). Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein(Abeta) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry.* **39**:6951-9.

Mitani, Y., Yarimizu, J., Saita, K., Uchino, H., Akashiba, H., Shitaka, Y., Ni, K., Matsuoka, N. (2012). Differential effects between γ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J Neurosci.* **32**:2037-50.

Mitomo, H., Chen, W.H., Regen, S.L. (2009). Oxysterol-induced rearrangement of the liquid-ordered phase: a possible link to Alzheimer's disease?. *J Am Chem Soc.* **131**:12354-7.

Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Mansson, J.E., Fredman, P. (2005). Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional

disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem.* **92**:171-82.

Moran, J., Patel, A.J. (1989). Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res.* **486**:15-25.

Moreira, P.I., Siedlak, S.L., Aliev, G., Zhu, X., Cash, A.D., Smith, M.A., Perry, G. (2005). Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. *J Neural Transm.* **112**:921-32.

Morimoto, T., Ohsawa, I., Takamura, C., Ishiguro, M., Nakamura, Y., Kohsaka, S. (1998). Novel domain-specific actions of amyloid precursor protein on developing synapses. *J Neurosci.* **18**:9386-93.

Morrison, C.D., Pistell, P.J., Ingram, D.K., Johnson, W.D., Liu, Y., Fernandez-Kim, S.O., White, C.L., Purpera, M.N., Uranga, R.M., Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N. (2010). High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. *J Neurochem.* **114**:1581-9.

Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Becherer, J.D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature.* **385**:733-6.

Moynagh, P.N. (2005). The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat.* **207**:265-9.

Mrak, R.E., Griffin, W.S.T. (2001). Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **22**:903-8.

Mulder, S.D., Veerhuis, R., Blankenstein, M.A., Nielsen, H.M. (2012). The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid- β clearance by adult human astrocytes. *Exp Neurol.* **233**:373-9.

Mungarro-Menchaca, X., Ferrera, P., Morán, J., Arias, C. (2002). beta-Amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J Neurosci Res.* **68**:89-96.

Munter, L.M., Voigt, P., Harmeier, A., Kaden, D., Gottschalk, K.E., Weise, C., Pipkorn, R., Schaefer, M., Langosch, D., Multhaup, G. (2007). GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J.* **26**:1702-12.

Murray, C.A., Lynch, M.A. (1998). Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci.* **18**:2974-81.

- Murray, I.V., Liu, L., Komatsu, H., Uryu, K., Xiao, G., Lawson, J.A., Axelsen, P.H.** (2007). Membrane-mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid beta proteins. *J Biol Chem.* **282**:9335-45.
- Musa, A., Lehrach, H., Russo, V.A.** (2001). Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Dev Genes Evol.* **211**:563-7.
- Müller, T., Concannon, C.G., Ward, M.W., Walsh, C.M., Tirniceriu, A.L., Tribl, F., Kögel, D., Prehn, J.H., Egensperger, R.** (2007). Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol Biol Cell.* **18**:201-10.
- Müller, U.C., Zheng, H.** (2012). Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**:a006288.
- Nadler, Y., Alexandrovich, A., Grigoriadis, N., Hartmann, T., Rao, K.S.J., Shohami, E., Stein, R.** (2008). Increased Expression of the γ -Secretase Components Presenilin-1 and Nicastrin in Activated Astrocytes and Microglia Following Traumatic Brain Injury. *Glia.* **56**:552-67.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Lee, H., Venkataraman, V., Wang, H.Y.** (2003). Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.* **971**:197-209.
- Nagele, R.G., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K.C.** (2004). Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **25**:663-74.
- Nakayama, K., Ohkawara, T., Hiratochi, M., Koh, C.S., Nagase, H.** (2008). The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron-specific apoptosis. *Neurosci Lett.* **444**:127-31.
- Nedergaard, M., Ransom, B., Goldman, S.A.** (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* **26**:523-30.
- Nelson, T.J., Alkon, D.L.J.** (2005). Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and b-amyloid peptide. *Biol Chem.* **280**:7377-87.
- Nicolson, G.L.** (2014). The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta.* **1838**:1451-66.
- Nielsen, H.M., Mulder, S.D., Beliën, J.A., Musters, R.J., Eikelenboom, P., Veerhuis, R.** (2010). Astrocytic Ab1-42 uptake is determined by Ab-aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia.* **58**:1235-46.
- Nieweg, K., Schaller, H., Pfrieder, F.W.** (2009). Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem.* **109**:125-34.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D., Tessier-Lavigne, M.** (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* **457**:981-9.

Nishimura, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Okochi, M., Furiya, Y., Mori, H., Oda, T., Kato, M., Iseki, E. (1997). Glial tau-positive structures lack the sequence encoded by exon 3 of the tau protein gene. *Neurosci Lett.* **224**:169-72.

Nunomura, A., Chiba, S., Lippa, C.F., Cras, P., Kalaria, R.N., Takeda, A., Honda, K., Smith, M.A., Perry, G. (2004). Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* **17**:108-13.

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**:759-67.

Nuttall, R.K., Silva, C., Hader, W., Bar-Or, A., Patel, K.D., Edwards, D.R., Yong, V.W. (2007). Metalloproteinases are enriched in microglia compared with leukocytes and they regulate cytokine levels in activated microglia. *Glia.* **55**:516-26.

Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* **29**:547-53.

Oberstein, T.J., Spitzer, P., Klafki, H.W., Linning, P., Neff, F., Knölker, H.J., Lewczuk, P., Wiltfang, J., Kornhuber, J., Maler, J.M. (2014). Astrocytes and microglia but not neurons preferentially generate N-terminally truncated Ab peptides. *Neurobiol Dis.* **73C**:24-35.

Ogata, K., Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience.* **113**:221-33.

Oishi, M., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Lim, G.S., Isohara, T., Gandy, S.E., Greengard, P., Suzuki, T. (1997). The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid precursor protein is phosphorylated at Thr654, Ser655, and Thr668 in adult rat brain and cultured cells. *Mol. Med.* **3**:111-23.

Okada, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., Matsuzaki, K. (2007). Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid beta-protein-(1-40) by monosialoganglioside GM1, a neuronal membrane component. *J Mol Biol.* **371**:481-9.

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). Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂. *J Biol Chem.* **277**:40302-8.

Orlandi, P.A., Fishman, P.H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* **141**:905-15.

Oster-Granite, M.L., McPhie, D.L., Greenan, J., Neve, R.L. (1996). Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* **16**:6732-41.

Ozaki, T., Li, Y., Kikuchi, H., Tomita, T., Iwatsubo, T., Nakagawara, A. (2006). The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **351**:57-63.

Paola, D., Domenicotti, C., Nitti, M., Vitali, A., Borghi, R., Cottalasso, D., Zaccheo, D., Odetti, P., Strocchi, P., Marinari, U.M., Tabaton, M., Pronzato, M.A. (2000). Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid beta-protein production and selective activation of beta1 and betaII PKCs in NT2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **268**:642-6.

Papassotiropoulos, A., Lütjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Buschfort, R., Ptok, U., Björkhem, I., von Bergmann, K., Heun, R. (2002). 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res.* **36**:27-32.

Paratcha, G., Ib-Òez, C.F. (2002). Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. *Curr Opin Neurobiol.* **12**:542-9.

Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Muller, U., St George-Hyslop, P., Checler, F. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron.* **46**:541-54.

Parton, R.G., Richards, A.A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic.* **4**:724-38.

Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R.M., Lenardo, M.J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., D'Adamio, L. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. *J Alzheimers Dis.* **2**:289-301.

Patel, A.J. and Hunt, A. (1985). Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocytes. *Dev Brain Res.* **18**:175-84.

Patil, S., Chan, C. (2005). Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* **384**:288-93.

Patil, S., Sheng, L., Masserang, A., Chan, C. (2006). Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci Lett.* **406**:55-9.

Patil, S., Melrose, J., Chan, C. (2007). Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *Eur J Neurosci.* **26**:2131-41.

Pekny, M., Leveen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C.H., Westermarck, B., Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J.* **14**:1590-8.

Pekny, M., Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* **50**:427-34.

Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* **565**:30-8.

- Pelvig, D.T., Pakkenberg, H., Stark, A.K., Pakkenberg, B.** (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging*. **29**:1754-62.
- Perez, R.G., Soriano, S., Hayes, J.D., Ostaszewski, B., Xia, W., Selkoe, D.J., Chen, X., Stokin, G.B., Koo, E.H.** (1999). Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem*. **274**:18851-6.
- 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**:417-21.
- 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 mammalian development. *Science*. **282**:1281-4.
- Pfriege, F.W.** (2003). Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes?. *Bioessays*. **25**:72-8
- Pietrzik, C.U., Hoffmann, J., Stober, K., Chen, C.Y., Bauer, C., Otero, D.A.C., Roch, J.M., Herzog, V.** (1998). From differentiation to proliferation: the secretory amyloid precursor protein as a local mediator of growth in thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**:1770-5.
- Pihlaja, R., Koistinaho, J., Malm, T., Sikkilä, H., Vainio, S., Koistinaho, M.** (2008). Transplanted astrocytes internalize deposited β -amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*. **56**:154-63.
- Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., Pearson, H.A.** (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci*. **23**:5531-5.
- Popp, J., Meichsner, S., Kölsch, H., Lewczuk, P., Maier, W., Kornhuber, J., Jessen, F., Lütjohann, D.** (2013). Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. **86**:37-42.
- Powell, E.M., Geller, H.M.** (1999). Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*. **26**:73-83.
- Prasanthi, J.R., Huls, A., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., Ghribi, O.** (2009). Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurodegener*. **4**:1.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H.A., Herms, J.** (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*. **26**:7212-21.
- Puglielli, L., Ellis, B.C., Saunders, A.J., Kovacs, D.M.** (2003). Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem*. **278**:19777-83.

Quintanilla, R.A., Orellana, J.A., von Bernhardt, R. (2012). Understanding risk factors for Alzheimer's disease: interplay of neuroinflammation, connexin-based communication and oxidative stress. *Arch Med Res.* **43**:632-44.

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. *Neurochem Int.* **55**:662-70.

Ramsden, M., Henderson, Z., Pearson, H.A. (2002). Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res.* **956**:254-61.

Ramsden, M., Plant, L.D., Webster, N.J., Vaughan, P.F., Henderson, Z., Pearson, H.A. (2001). Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1-40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones. *J Neurochem.* **79**:699-712.

Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J., Black, R.A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem.* **275**:14608-14.

Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas- Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S., Duff, K.E. (2001). A cholesterol lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* **8**:890-9.

Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R.L., Gendelman, H.E. (2007). Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol.* **82**:297-325.

Riddell, D. R., Christie, G., Hussain, I., and Dingwall, C. (2001). Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol.* **11**:1288-93.

Roßner, S., Apelt, J., Schliebs, R., Perez-Polo, J.R., Bigl, V. (2001). Neuronal and glial β -secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology. *J Neurosci Res.* **64**:437-46.

Roßner, S., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., Perez-Polo, J.R. (2005). Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J Neurochem.* **92**:226-34.

Rodrigues Siqueira, I., Fochesatto, C., da Silva Torres, I.L., Dalmaz, C., Alexandre Netto, C. (2005). Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sci.* **78**:271-8.

Roher, A.E., Weiss, N., Kokjohn, T.A., Kuo, Y.M., Kalback, W., Anthony, J., Watson, D., Luehrs, D.C., Sue, L., Walker, D., Emmerling, M., Goux, W., Beach, T. (2002). Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry.* **41**:11080-90.

- Rosales-Corral, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Ortiz, G.G., Lopez-Armas, G. (2010). Functional aspects of redox control during neuroinflammation. *Antioxid Redox Signal*. **13**:193-247.
- Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C.F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D.E., Volterra, A. (2008). Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ*. **15**:1691-700.
- Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., de Bernard, M., Beyreuther, K., Pepperkok, R., Hartmann, T. (2002). Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci*. **22**:1679-89.
- Russ, W.P., Engelman, D.M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol*. **296**:911-19.
- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., Greengard, P. (2003). The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo. *J Neurosci*. **23**:5407-15.
- Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J.M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., Oltersdorf, T., Schenk, D.B. (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*. **58**:615-22.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M.M., Teplow, D.B., Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep*. **2**:835-41.
- Satoh, J., Kuroda, Y. (2001). Nicastrin, a key regulator of presenilin function, is expressed constitutively in human neural cell lines. *Neuropath*. **21**:115-22.
- Schipper, H.M. (2011). Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiol Aging*. **32**:778-90.
- Seifert, G., Schilling, K., Steinhäuser, C. (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. **7**:194-206.
- Selkoe, D.J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. **8**:447-53.
- Senes, A., Engel, D.E., DeGrado, W.F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol*. **14**:465-47.
- Shah, S., Lee, S-F., Tabuchi, K., Hao, Y-H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann III, C.E., Sudhof, T., Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor. *Cell*. **122**:435-47.
- Shih, A.Y., Johnson, D.A., Wong, G., Kraft, A.D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J.A., Murphy, T.H. (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci*. **23**:3394-406.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Wegrzynowicz, M., Lee, E., Bowman, A.B., Aschner, M. (2011). Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol*. **39**:115-23.

- Silver, J., Miller, J.H.** (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* **5**:146-56.
- Simons, K., Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**:569-72.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., Simons, K.** (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:6460-4.
- Simons, K., Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**:31-9.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* **175**:720-31.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S.M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V.** (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature.* **402**:537-40.
- Slomnicki, L.P., Lesniak, W.** (2008). A putative role of the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) in transcription. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* **68**:219-28.
- Small, G.W.** (1998). The pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry.* **59**:7-14.
- Smith, M.A., Zhu, X., Tabaton, M., Liu, G., McKeel, D.W.Jr., Cohen, M.L., Wang, X., Siedlak, S.L., Dwyer B.E., Hayashi, T., Nakamura, M., Nunomura, A., Perry, G.** (2010). Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* **19**:363-72.
- Smith-Swintosky, V.L., Pettigrew, L.C., Craddock, S.D., Culwell, A.R., Rydel, R.E., Mattson, M.P.** (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J Neurochem.* **63**:781-4.
- Sodhi, R.K., Singh, N.** (2013). Liver X receptors: emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmacol Res.* **72**:45-51.
- Sofroniew, M. V.** (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* **32**:638-47.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V.** (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**:7-35.
- Solans, A., Estivill, X., de la Luna, S.** (2000). A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein β -secretase. *Cytogenet Cell Genet.* **89**:177-84.
- Song, Y., Hustedt, E.J., Brandon, S., Sanders, C.R.** (2013). Competition between homodimerization and cholesterol binding to the C99 domain of the amyloid precursor protein. *Biochemistry.* **52**:5051-64.

Sparks, D.L. (1997). Coronary artery disease, hypertension, apoE, and cholesterol: A link to Alzheimer's disease?. *Ann NY Acad Sci.* **826**:128-46.

Sparks, D.L., Scheff, S.W., Hunsaker III, J.C., Liu, H., Landers, T., Gross, D.R. (1994). Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol.* **126**:88-94.

Suh, S.W., Bergher, J.P., Anderson, C.M., Treadway, J.L., Fosgerau, K., Swanson, R.A. (2007). Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316, 819 ([R-R*, S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther.* **321**:45-50.

Sultana, R., Piroddi, M., Galli, F., Butterfield, D.A. (2008). Protein levels and activity of some antioxidant enzymes in hippocampus of subjects with amnesic mild cognitive impairment. *Neurochem Res.* **33**:2540-6.

Suzuki, T., Nairn, A.C., Gandy, S.E., Greengard, P. (1992). Phosphorylation of Alzheimer amyloid precursor protein by protein kinase C. *Neuroscience.* **48**:755-61.

Svennerholm, L., Gottfries, C.G. (1994). Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J Neurochem.* **62**:1039-47.

Tamagno, E., Bardini, P., Obbili, A., Vitali, A., Borghi, R., Zaccheo, D., Pronzato, M.A., Danni, O., Smith, M.A., Perry, G., Tabaton, M. (2002). Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis.* **10**:279-88.

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. (2008). Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem.* **104**:683-95.

Tamagno, E., Guglielmotto, M., Bardini, P., Santoro, G., Davit, A., Di Simone, D., Danni, O., Tabaton, M. (2003). Dehydroepiandrosterone reduces expression and activity of BACE in NT2 neurons exposed to oxidative stress. *Neurobiol Dis.* **14**:291-301.

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 APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stressactivated protein kinases pathways. *J Neurochem.* **92**:628-36.

Tamboli, I.Y., Prager, K., Barth, E., Heneka, M., Sandhoff, K., Walter, J. (2005). Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide. *J Biol Chem.* **280**:28110-7.

Tanabe, Y., Kasahara, T., Momoi, T., Fujita, E. (2008). Neuronal RA175/SynCAM1 isoforms are processed by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM17-like proteases. *Neurosci Lett.* **444**:16-21.

Tarassishin, L., Yin, Y.I., Bassit, B., Li, Y.M. (2004). Processing of Notch and amyloid precursor protein by gamma-secretase is spatially distinct. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**:17050-5.

Tesco, G., Koh, Y.H., Kang, E.L., Cameron, A.N., Das, S., Sena-Esteves, M., Hiltunen, M., Yang, S.H., Zhong, Z., Shen, Y., Simpkins, J.W., Tanzi, R.E. (2007). Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron*. **54**:721-37.

Thal, D.R., Schultz, C., Deghani, F., Yamaguchi, H., Braak, H., Braak, E. (2000). Amyloid beta-protein (Abeta)-containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated Abeta deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathol*. **100**:608-17.

Thinakaran, G., Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. **283**:29615-9.

Tominaga-Yoshino, K., Uetsuki, T., Yoshikawa, K., Ogura, A. (2001). Neurotoxic and neuroprotective effects of glutamate are enhanced by introduction of amyloid precursor protein cDNA. *Brain Res*. **918**:121-30.

Tong, Y., Zhou, W., Fung, V., Christensen, M.A., Qing, H., Sun, X., Song, W. (2005). Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Abeta generation. *J Neural Transm*. **112**:455-69.

Trapp, B.D., Hauer, P.E. (1994). Amyloid precursor protein is enriched in radial glia—implications for neuronal development. *J Neurosci Res*. **37**:538-50.

Tun, H., Marlow, L., Pinnix, I., Kinsey, R. Sambamurti, K. (2002). Lipid rafts play an important role in A β biogenesis by regulating the β -secretase pathway. *J Mol Neurosci*. **19**:31-5.

Tyan, S.-H., Shih, A.Y.-J., Walsh, J.J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., Eggert, S., Hof, P.R., Koo, E.H., Dickstein, D.L. (2012). Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol Cell Neurosci*. **51**:43-52.

Uranga, R.M., Bruce-Keller, A.J., Morrison, C.D., Fernandez-Kim, S.O., Ebenezer, P.J., Zhang, L., Dasuri, K., Keller, J.N. (2010). Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. *J Neurochem*. **114**:344-61.

Urano, Y., Ochiai, S., Noguchi, N. (2013). Suppression of amyloid- β production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking. *FASEB J*. **27**:4305-15.

Uryu, K., Laurer, H., McIntosh, T., Praticò, D., Martinez, D., Leight, S., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2002). Repetitive mild brain trauma accelerates Abeta deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*. **22**:446-54.

Vassar, R. (2003). BACE1. The β -Secretase Enzyme in Alzheimer's Disease. *J Mol Neurosci*. **23**:105-14.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, 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., Jarosinski, 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**:735-41.
- Vassar, R., Kovacs, D.M., Yan, R., Wong, P.C.** (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci*. **29**:12787-94.
- Vaya, J., Schipper, H.M.** (2007). Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease. *J Neurochem*. **6**:1727-37.
- Verkhatsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Sofroniew, M.** (2014). Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*. **42**:1291-301.
- Vetrivel, K.S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P.C., Xu, H., Thinakaran, G.** (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem*. **279**:44945-54.
- Vetrivel, K.S., Meckler, X., Chen, Y., Nguyen, P.D., Seidah, N.G., Vassar, R., Wong, P.C., Fukata, M., Kounnas, M.Z., Thinakaran, G.** (2009). Alzheimer disease A β production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. *J Biol Chem*. **284**:3793-803.
- Vetrivel, K.S., Thinakaran, G.** (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochem Biophys Acta*. **1801**:860-7.
- Vetrivel, K.S., Zhang, Y.W., Xu, H., Thinakaran, G.** (2006). Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener*. **1**:4.
- Vincent, B., Govitrapong, P.** (2011). Activation of the α -secretase processing of A β PP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **24**:75-94.
- Vitkovic, L., Bockaert, J., Jacque, C.** (2000). "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?. *J Neurochem*. **74**:457-1.
- Volterra, A., Meldolesi, J.** (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. **6**:626-40.
- von Arnim, C.A., Kinoshita, A., Peltan, I.D., Tangredi, M.M., Herl, L., Lee, B.M., Spoelgen, R., Hshieh, T.T., Ranganathan, S., Battey, F.D., Liu, C.X., Bacskai, B.J., Sever, S., Irizarry, M.C., Strickland, D.K., Hyman, B.T.** (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem*. **280**:17777-85.
- von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H., Price, D.L., Sisodia, S.S.** (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging*. **18**:661-9.
- von Rotz, R.C., Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., Konietzko, U.** (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci*. **117**:4435-48.

Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A.C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Younkin, S.G., Golde, T.E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis.* **9**:11-23.

Wakabayashi, T., De Strooper, B. (2008). Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)*. **23**:194-204.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. **416**:535-9.

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**:133-40.

Wang, N., Yvan-Charvet, L., Lütjohann, D., Mulder, M., Vanmierlo, T., Kim, T.W., Tall, A.R. (2008). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J.* **22**:1073-82.

Wang, R., Tang, P., Wang, P., Boissy, R.E., Zheng, H. (2006). Regulation of tyrosinase trafficking and processing by presenilin: Partial loss of function by familial Alzheimer's disease mutation. *Proc Natl Acad Sci.* **103**:353-8.

Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., Sofroniew, M.V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci.* **33**:12870-86.

Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry.* **41**:2825-35.

Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* **57**:115-26.

Wen, Y., Onyewuchi, O., Yang, S., Liu, R., Simpkins, J.W. (2004). Increased beta-secretase activity and expression in rats following transient cerebral ischemia. *Brain Res.* **1009**:1-8.

Wen, Y., Yu, W.H., Maloney, B., Bailey, J., Ma, J., Marié, I., Maurin, T., Wang, L., Figueroa, H., Herman, M., Krishnamurthy, P., Liu, L., Planel, E., Lau, L.F., Lahiri, D.K., Duff, K. (2008). Transcriptional regulation of β -secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron.* **57**:680-90.

Wharton, S. B., O'Callaghan, J. P., Savva, G. M., Nicoll, J. A., Matthews, F., Simpson, J.E., Forster, G., Shaw, P. J., Brayne, C., Ince, P. G. MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study

Group. (2009) Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* **27**:465-73.

WHO. (2012). Dementia: A Public Health Priority. *World Health Organization.*

Wiley, H.S., Woolf, M.F., Opresko, L.K., Burke, P.M., Will, B., Morgan, J.R., Lauffenburger, D.A. (1998). Removal of the membrane-anchoring domain of epidermal growth factor leads to intracrine signaling and disruption of mammary epithelial cell organization. *J Cell Biol.* **143**:1317-28.

Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**:17513-8.

Wilson, C., Murphy, D.D., Giasson, B.I., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, M-Y.V. (2004). Degradative organelles containing mislocalized a- and b-synuclein proliferate in presenilin-1 null neurons. *J Cell Biol.* **165**:335-46.

Wisniewski, T., Ghiso, J., Frangione, B. (1991). Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun.* **179**:1247-54.

Wolf, F., Kirchhoff, F. (2008). Neuroscience. Imaging astrocyte activity. *Science.* **320**:1597-9.

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**:513-7.

Wolozin, B. (2001). A fluid connection: cholesterol and A β . *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**:5371-3.

Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* **57**:1439-43.

Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem.* **280**:23009-17.

Wood, W.G., Li, L., Müller, W.E., Eckert, G.P. (2014). Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem.* **129**:559-72.

Xiu, J., Nordberg, A., Qi, X., Guan, Z.Z. (2006). Influence of cholesterol and lovastatin on alpha-form of secreted amyloid precursor protein and expression of alpha7 nicotinic receptor on astrocytes. *Neurochem Int.* **49**:459-65.

Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A.C., Sisodia, S.S., Greengard, P., Gandy, S. (1997). Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:3748-52.

Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., Huang, Y. (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J Neurosci.* **26**:4985-94.

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**:533-7.

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., Dawes, L.R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M.L., Neve, R.L. (1989). Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science.* **245**:417-20.

Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W. (2005). Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:18700-5.

Yiu, G., He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* **7**:617-27.

Youmans, K.L., Tai, L.M., Nwabuisi-Heath, E., Jungbauer, L., Kanekiyo, T., Gan, M., Kim, J., Eimer, W.A., Estus, S., Rebeck, G.W., Weeber, E.J., Bu, G., Yu, C., Ladu, M.J. (2012). APOE4-specific changes in A β accumulation in a new transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* **287**:41774-86.

Young, J.M., Lee, R.K.K., Jhaveri, S., Wurtman, R.J. (1999). Intracellular and cell-surface distribution of amyloid precursor protein in cortical astrocytes. *Brain Research Bulletin.* **50**:27-32.

Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J., Selkoe, D.J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci.* **27**:14459-69.

Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* **32**:6391-410.

Zha, Q., Ruan, Y., Hartmann, T., Beyreuther, K., Zhang, D. (2004). GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry.* **9**:946-52.

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keefe, S., Phatnani, H.P, Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S.A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B.A., Wu, J.Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* **34**:11929-47.

Zhang, Y.W., Wang, R., Liu, Q., Zhang, H., Liao, F.F., Xu, H. (2007). Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc Natl Acad Sci.* **104**:10613-8.

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

Zhang, X., Zhou, K., Wang, R., Cui, J., Lipton, S.A., Liao, F.F., Xu, H., Zhang, Y.W. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation. *J Biol Chem.* **282**:10873-80.

Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M.Z., Kim, S.H., Xu, X. (2004). Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* **279**:50647-50.

Zhao, G., Tan, J., Mao, G., Cui, M.Z., Xu, X. (2007). The same gamma-secretase accounts for the multiple intramembrane cleavages of APP. *J Neurochem.* **100**:1234-46.

Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., Logan, S., Maus, E., Citron, M., Berry, R., Binder, L., Vassar, R. (2007). Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci.* **27**:3639-49.

Zhao, W.Q., Santini, F., Breese, R., Ross, D., Zhang, X.D., Stone, D.J., Ferrer, M., Townsend, M., Wolfe, A.L., Seager, M.A., Kinney, G.G., Shughrue, P.J., Ray, W.J. (2010). Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J Biol Chem.* **285**:7619-32.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., Stevens, K.A., Slunt, H.H., Sisoda, S.S., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell.* **81**:525-31.

Zhu, Y., Carvey, P. M., Ling, Z. (2006). Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res.* **1090**:35-44.

Zhu, X., Lee, H.G., Casadesus, G., Avila, J., Drew, K., Perry, G., Smith, M.A. (2005). Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* **31**:205-17.

Zhu, X., Raina, A.K., Perry, G., Smith, M.A. (2004). Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* **3**:219-26.

Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M.A., Perry, G. (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci.* **64**:2202-10.

11. APÉNDICES

Avila-Muñoz, E., Arias, C. (2015). Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia*. In press. doi: 10.1002/glia.22874.

Avila-Muñoz, E., Arias, C. (2014). When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* **18**:29-40.

Cholesterol-Induced Astrocyte Activation is Associated with Increased Amyloid Precursor Protein Expression and Processing

Evangelina Avila-Muñoz and Clorinda Arias

Cholesterol is essential for maintaining lipid raft integrity and has been regarded as a crucial regulatory factor for amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD). The vast majority of studies on amyloid precursor protein (APP) metabolism and amyloid β -protein (A β) production have focused on neurons. The role of astrocytes remains largely unexplored, despite the presence of activated astrocytes in the brains of most patients with AD and in transgenic models of the disease. The role of cholesterol in A β production has been thoroughly studied in neurons and attributed to the participation of lipid rafts in APP metabolism. Thus, in this study, we analyzed the effect of cholesterol loading in astrocytes and analyzed the expression and processing of APP. We found that cholesterol exposure induced astrocyte activation, increased APP content, and enhanced the interaction of APP with BACE-1. These effects were associated with an enrichment of ganglioside GM1-cholesterol patches in the astrocyte membrane and with increased ROS production.

GLIA 2015;00:000–000.

Key words: cultured astrocytes, APP metabolism, ROS, lipid rafts

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by synaptic damage, extracellular deposits of amyloid β -protein (A β), and intracellular accumulation of neurofibrillary tangles. A β peptides are derived from the amyloid precursor protein (APP) through the amyloidogenic pathway. In healthy individuals, most of the APP is constitutively cleaved within the A β sequence by α -secretase enzymes (TACE/ADAM17 and/or ADAM10) generating the soluble ectodomain of APP (sAPP α) and a truncated C-terminal peptide (CTF- α or C-83). In the amyloidogenic pathway, APP is proteolyzed by β -secretase (BACE-1) forming the smaller membrane bound C-terminal fragment (CTF- β or C-99), which is further cleaved by the γ -secretase leading to A β formation (Cai et al., 2001; De Strooper, 2003; De Strooper and Annaert, 2000; Glenner and Wong, 1984; Iwatsubo, 2004; Shiraishi et al., 2006; Vassar et al., 1999).

By combining fractionation with nonionic detergent extraction analysis, it has been found that β - and γ -secretases reside in cholesterol- and sphingolipid-rich detergent-resistant

lipid raft microdomains of neuronal membranes, where processing of APP to A β mainly occurs (Ehehalt et al., 2003; Golub et al., 2004; Kawarabayashi et al., 2004; Koo and Squazzo, 1994; Lucero and Robbins, 2004; Riddell et al., 2001; Vetrivel et al., 2004; Wahrle et al., 2002). Marquer et al., (2011) have demonstrated that cholesterol selectively increases the proximity of APP and BACE-1 within the membrane and relocates APP to lipid rafts. This results in increased A β production caused by changes in BACE-1's accessibility to its substrate, rather than having a direct impact on the catalytic activity of the enzyme. Disturbances in cholesterol homeostasis have been implicated in AD pathogenesis. Furthermore, cumulative studies have found a positive correlation between the level of circulating cholesterol and the A β load in AD's brain (Kuo et al., 1998) as well as an increased risk of developing the pathology when cholesterol is elevated in middle age (Kivipelto et al., 2001). Following this line of evidence, retrospective studies have found a significant reduction in the prevalence and incidence of AD in patients given statins to lower their cholesterol (Jick et al.,

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/glia.22874

Published online Month 00, 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). Received Nov 27, 2014, Accepted for publication June 1, 2015.

Address correspondence to Clorinda Arias, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 70-228, 04510 México DF, México. E-mail: carias@unam.mx

From the Departamento De Medicina Genómica Y Toxicología Ambiental, Instituto De Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma De México, D.F. México

2000; Wolozin et al., 2000). In fact, the presence of the $\epsilon 4$ allele of ApoE, which is associated with cholesterol transport in the brain, is one of most well studied risk factors for developing AD. Recently, genome-wide association studies have identified polymorphisms in genes associated with cholesterol homeostasis, including ABCA1, ABCA7, and CLU (Harold et al., 2009; Naj et al., 2011; Seshadri et al., 2010). Experimental evidence has shown that high-cholesterol diets increase the formation of amyloid plaques in rabbits (Sparks et al., 1994). On the contrary, the consumption of high cholesterol or cholesterol-lowering drugs modulates A β deposition for guinea pigs and in transgenic mice models of AD, thus showing a positive correlation between plasma levels of cholesterol and the cerebral A β load (Fassbender et al., 2001; Levin-Allerhand et al., 2002; Refolo et al., 2001; Shie et al., 2003). These findings indicate a dysregulation of cholesterol homeostasis in AD that may include changes in cholesterol metabolism within cell membranes. As a result of this dysregulated metabolism, it is likely that alteration in cholesterol levels in the normally cholesterol-enriched lipid-rafts may have an impact on APP metabolism.

Although the majority of studies on APP processing have been performed in neurons, recent studies suggest that astrocytes could participate in the amyloidogenic processing of APP (reviewed in Avila-Muñoz and Arias, 2014). Studies on human brain samples showed an increase in reactive gliosis that appears to precede the development of the characteristic lesions of AD (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011; Wharton et al., 2009). Recent findings suggest that aberrant activation of glia may substantially contribute to neuronal cell damage and neurite changes in AD (Perez-Nievas et al., 2013). In this disease, astrogliosis occurs in such a way that astrocytes are in close proximity to amyloid plaques or diffuse deposits surrounding them (Nagele et al., 2004; Thal et al., 2000). Astrocytes express APP, BACE-1, and γ -secretase (Burton et al., 2002; Busciglio et al., 1993; Diehlmann et al., 1999; Hartlage-Rubsamen et al., 2003; Miake et al., 1999; Nadler et al., 2008; Rossner et al., 2001, 2005; Uryu et al., 2002; Young et al., 1999). Moreover, it has been reported that cultured human neurons and astrocytes produce far more amyloidogenic A β compared with rodent primary cultures (LeBlanc et al., 1997). It is known that astrocytes exposed to cholesterol exhibit a decrease in sAPP α production and cell viability, whereas treatment with lovastatin increases the processing of APP by α -secretase, thus favoring the non-amyloidogenic pathway (Xiu et al., 2006). Animal models of Niemann-Pick Type C disease (NPC) (which is characterized by intracellular accumulation of cholesterol and glycosphingolipids in many tissues including the brain) present elevated levels of A β and reactive astrocytes expressing high levels of APP, BACE-1 and γ -secretase (Kodam et al., 2010). Although

in resting condition, astrocytes express low levels of APP, this protein strongly increases its expression in models of brain injury where extensive gliosis occurs (Siman et al., 1989). These evidence point to the potential contribution of astrocytes to increase the amyloid load in brain of AD.

However, the metabolic conditions that affect APP processing in astrocytes have not been well characterized, despite the fact that astrocytes are the most abundant glial cells in the CNS and are fundamental in maintaining neuronal homeostasis. For this reason, the aim of this work was to analyze the relationships between cholesterol content and the expression of APP and amyloid fragments in cultured astrocytes. The pathological implications of these results are considered in the discussion.

Materials and Methods

Materials and Reagents

Basal Eagle's medium (SIGMA-Aldrich), Glutamine (Gibco), Pen-Strepto (Gibco), Fetal Bovine Serum (Byproducts), Cholesterol (SIGMA-Aldrich), Lovastatin (Calbiochem), Euk-134 (SIGMA-Aldrich), Filipin III (SIGMA-Aldrich), A-agarose (Millipore), glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (Dako), neuronal nuclei protein (NeuN) antibody (Millipore), APP 22C11 antibody (Millipore), APP A4 (I-17) antibody (Santa Cruz Biotechnology), APP (EPR5118) antibody (ABCAM), BACE-1 antibody (Cell Signaling), β -actin (SIGMA-Aldrich), goat anti-mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology), goat anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology), chicken anti-goat antibody (Chemicon), goat anti-rabbit Alexa 546 antibody (Invitrogen), donkey anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen), goat anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen), fluorescent mounting medium (Dako), AmershamTM HybondTM-ECL membranes (GE Healthcare), ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), BioMax Light Films (Kodak), Human A β 42 ELISA Kit (Invitrogen), Human A β 40 ELISA Kit (Invitrogen), Dihydroethidium (SIGMA-Aldrich), Dihydrorhodamine (DHR) 123 (SIGMA-Aldrich), Cholera Toxin Subunit B (CT-B; Invitrogen), Zeiss LSM5 Confocal Microscope (Carl Zeiss), BX51 WI Disc Scanning Unit (DSU) Microscope (Olympus), IX71 Inverted Microscope (Olympus), ImageJ software version 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health), and GraphPad Prism software version 4.00 (GraphPad Software).

Primary Astrocyte Culture

Astrocytes were isolated from the cortex of 1 to 3-day-old Wistar rats as described by Morán and Patel (1989), with some modifications. Briefly, postnatal brain cortices were isolated and the meninges and blood vessels were removed. The dissociated cell suspensions were plated at a density of $210 \times 10^3/\text{cm}^2$ in 12-well plates. The culture medium consisted of basal Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 750 mg glucose, 50 U/ml penicillin, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. The culture dishes were incubated at 37°C in 5% CO₂ in a humidified air incubator. After 12 days *in vitro*, the cultures were treated for 48 h with different concentrations of cholesterol (25 or 50 μM),

which was dissolved in ethanol and added to the cultures at a final concentration of 0.3% or the cultures were treated with lovastatin (10 μ M) for 24 or 48 h. Control cultures were exposed to the vehicle (0.3% ethanol). Total cholesterol is at concentrations of 132.33 μ M in the cultured medium. The vast majority is complexed in lipoproteins, but free cholesterol corresponds to 5.28 μ M. Thus, exogenously added cholesterol (25 or 50 μ M) increased total cholesterol by ~30 and 60%, respectively.

For lovastatin incubations, the serum was removed from the medium and the results were compared with controls under the same conditions. The purity of astrocytes (> 90%) was verified immunocytochemically using GFAP and NeuN as markers for astrocytes and neurons, respectively.

Cholesterol Labeling

The blue fluorescent probe, filipin (Bornig and Geyer, 1974), was used to study the distribution of nonsterified cholesterol. Astrocytes growing on coverslips were exposed to different concentrations of cholesterol for 48 h. Then the cells were washed three times in 1 \times PBS, fixed in 4% of 0.1 M paraformaldehyde/PB, and blocked and permeabilized in 1 \times PBS/0.2% Triton X-100 solutions. The cells were then incubated in the dark with 100 ng/ml of filipin in 1 \times PBS for 2 h. After three washes with 1 \times PBS, the cells were observed at 20 and 40 \times magnifications under an inverted fluorescence microscope (Olympus 1X71) at 360 nm excitation and 460 nm emission.

Lipid Raft Staining

To stain the lipid rafts, astrocytes were cultured following the immunofluorescence protocol that is based on the binding of the CTB subunit to the glucosphingolipid GM1 ganglioside (GM1). After treatment with 50 μ M cholesterol for 48 h, the culture medium was removed and the cells were incubated with 1 μ g/ml CTB-Alexa Fluor 555 (Blank et al., 2007) for 2 h before fixation with 1% paraformaldehyde/0.1 M PB for 5 min. After three washes with 1 \times PBS, cells were incubated with H \ddot{o} chst for 20 min. Astrocytes were observed using a confocal microscope.

Immunoblot Analysis

Protein content of the cell lysates was measured using the Bio-Rad DCTM protein assay kit. Equal amounts of protein (20 or 90 μ g) were loaded in 10, 12, or 15% Bis-Tris acrylamide SDS gels and transferred onto AmershamTM HybondTM-ECL membranes. The blots were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST), pH 8.0, for 1 h at room temperature (RT) or overnight at 4 $^{\circ}$ C. Subsequently, the blots were incubated with the following primary antibodies (1:1000) overnight at 4 $^{\circ}$ C: total APP and sAPP α (22C11); C-99 and C-83 (A4, I-17); sAPP β APP (EPR5118); BACE-1 (1:500), GFAP (1:1000), and β -actin (1:1000). After three washes with TBST, membranes were incubated with either, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse antibodies (1:5000), goat anti-rabbit antibodies (1:6000), or chicken anti-goat antibodies (1:20000) for 2 h at RT then detected using ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate reagents and Kodak BioMax Light Films. For relative quantification

of immunosignal, band intensities were analyzed with ImageJ software.

Coimmunoprecipitation Analysis

To analyze protein interactions between APP and BACE-1, coimmunoprecipitation analysis was carried out according to the Protein A-agarose manufacturer protocol for immunoprecipitation (Millipore), with some modifications. Cell lysates were prepared at a concentration of 1 μ g/ μ l of protein. 500 μ g of cell lysate was added to a microfuge tube followed by the addition of the anti-APP antibody. The reaction mixture was incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with gentle rocking. Then, 100 μ l of protein A-agarose was added to immobilize immunocomplexes. After 2 h at 4 $^{\circ}$ C, protein complexes were washed, eluted, and analyzed by Western blotting.

Immunofluorescence

Astrocytes were grown on coverslips in 12-well plates. After different treatments, the cells were washed with cold 0.1 M PB twice, fixed with 4% paraformaldehyde/0.1 M PB for 20 min, and washed three times with 0.1 M PB/0.3% Triton X-100. Cells were permeabilized with 0.1 M PB containing 0.3% Triton X-100 for 10 min and left in blocking solution (0.1 M PB/0.3% Triton X-100/5% BSA) for 2 h at RT or overnight at 4 $^{\circ}$ C. Then, cells were incubated with anti-GFAP antibody (1:1000), anti-APP antibody 22C11 (1:1000) or anti-BACE-1 antibody (1:1000) overnight at 4 $^{\circ}$ C and washed three times with 0.1 M PB/0.3% Triton X-100. Subsequently, cells were immediately incubated with goat anti-rabbit Alexa 546 antibody (1:1000), donkey anti-mouse Alexa 488 (1:1000) or goat anti-rabbit Alexa 488 (1:1000) for 1 h at RT. Then cells were washed and covered with fluorescent mounting medium (DAKO) and analyzed with a confocal microscope or DSU microscope. Cross-reactivity was excluded by using appropriate controls (control sections were incubated in the same solutions as experimental sections but without primary antibodies).

A β 42 and A β 40 ELISA

A β 42 or A β 40 peptides secreted into the culture media by astrocytes were measured by sandwich enzyme-linked immunoabsorbant assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions. In brief, a 96-well plate was coated with the monoclonal antibody specific for the amino-terminus of human A β . The standards of HuA β 42 or HuA β 40 were prepared at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, and 0 pg/ml and added to the standard wells. The samples were diluted to appropriate concentrations for the tests and added to the wells. The antibodies against A β 42 or A β 40 were added and incubated for 3 h at RT. After washing, rabbit IgG HRP working solution was aggregated and incubated for 30 min at RT. Stabilized chromogen was added and the plate was incubated for 30 min. After incubation, an inactivation solution was added. Absorbance of each sample was measured using a microplate reader/spectrophotometer. Peptide levels were normalized with respect to the total protein concentration for each cell lysate and expressed as pg/mg of total protein or percent of control.

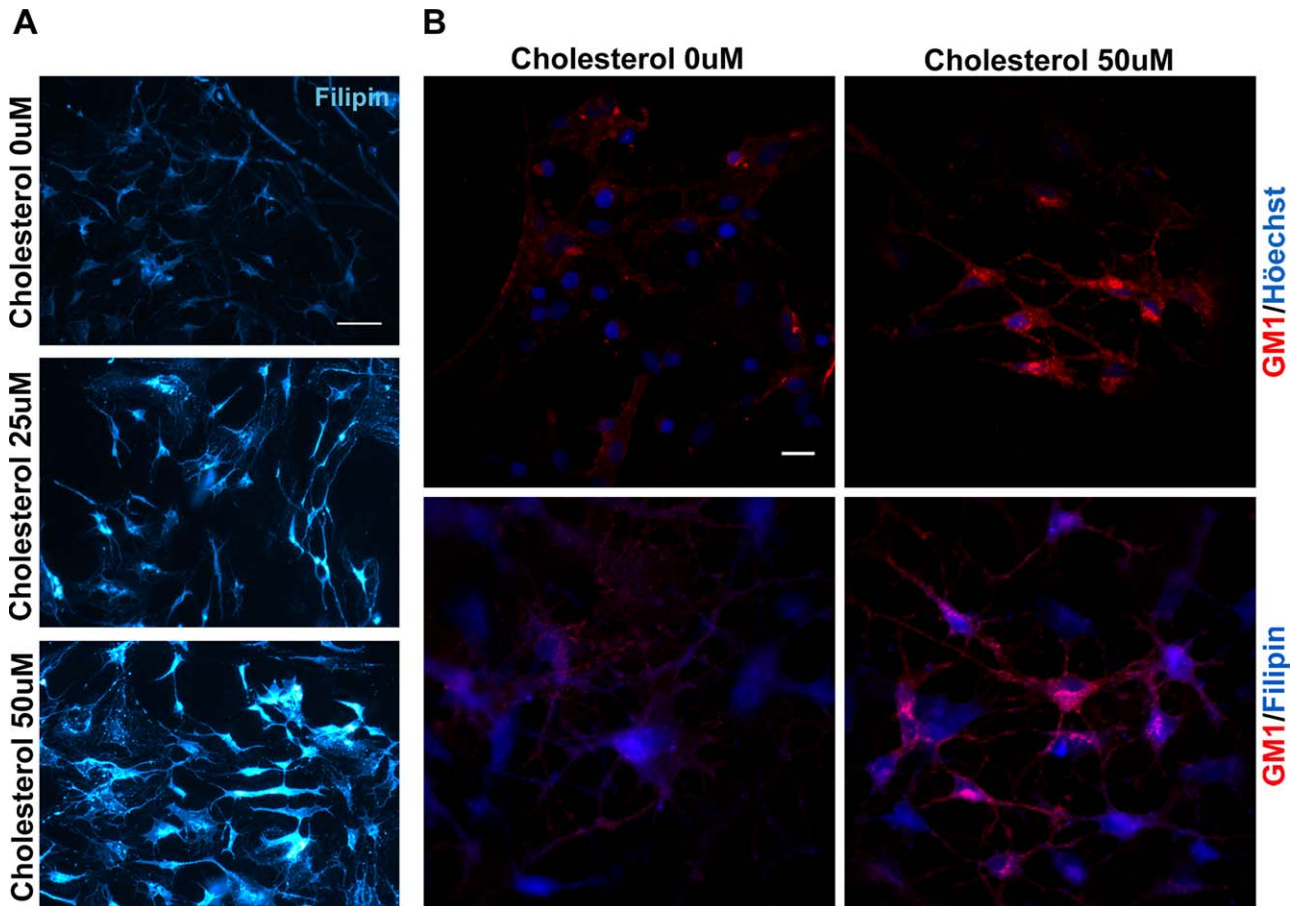


FIGURE 1: Cholesterol load and GM1 localization in astrocytes. Astrocytes were incubated with 25 and 50 μM cholesterol for 48 h. **A:** Cells were stained with 100 ng/ml of filipin (cyan blue). 10 \times . Scale bar: 80 μm . **B:** Astrocytes were treated with 50 μM of cholesterol for 48 h. Top panel: cells were stained with CTB to label GM1 gangliosides (red) and nuclei with Hoechst (blue); Bottom panel: astrocytes were stained with CTB (red) and filipin (blue). 10 \times . Scale bar: 80 μm .

ROS Measurement

Astrocytes were cultured in the same manner as in the immunofluorescence protocol. After the following treatments, the culture medium was removed and the cells were incubated with 2 μM dihydroethidium for 2 h: (1) 25 or 50 μM cholesterol for 48 h with or without antioxidant or (2) 25 μM Euk-134 (a synthetic superoxide dismutase/catalase mimetic) for 24 h. Then astrocytes were fixed with 1% paraformaldehyde/0.1 M PB for 5 min, washed with 1 \times PBS three times and incubated with Hoechst for 20 min. Finally, cells were washed three times with 1 \times PBS and observed at 5 \times magnifications under an inverted fluorescence microscope (Olympus 1X71) at 535 nm excitation and 610 nm emission. As a positive control for ROS formation, cells were treated with 25 μM H_2O_2 for 2 h. ROS were also determined with a modified fluorometric assay, which employs DHR 123 as the probe (Lee et al., 2003). When DHR is oxidized by H_2O_2 in the presence of peroxidases it produces the fluorescent compound rhodamine 123 (RDH; Gomes et al., 2005). After treatments astrocytes were scraped and 100 μl aliquot of the samples was centrifuged at 1200 rpm for 5 min. Then, 180 μl of buffer containing in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 0.8 MgSO_4 , 1.8 CaCl_2 , 5 glucose, 15 HEPES, and 20 μl of 1 μM DHR were added to the pellet and incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 2 min. The fluorescent prod-

uct RDH was measured using a spectrophotometer at 505 nm and extrapolated in a curve of RDH.

Statistical Analysis

Intensities of densitometric scanning of specific bands obtained from western blots were quantified with ImageJ software. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and Dunnett's *post hoc* test using the GraphPad Prism 4 software program. At least three independent astrocyte cultures from a pool of five cortices were analyzed for each experiment. The data are presented as the mean \pm standard deviation of and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Cholesterol Promotes the Formation of Lipid Raft Patches

To investigate the effect of cholesterol on astrocyte morphology and metabolism, we first determined the extent of cholesterol incorporation into the astrocytes from cholesterol included as a supplement in the media. Astrocytes were stained with filipin after being exposed to 25 or 50 μM cholesterol for 48 h. Figure 1A shows the dose-dependent incorporation of cholesterol distributed along the soma and

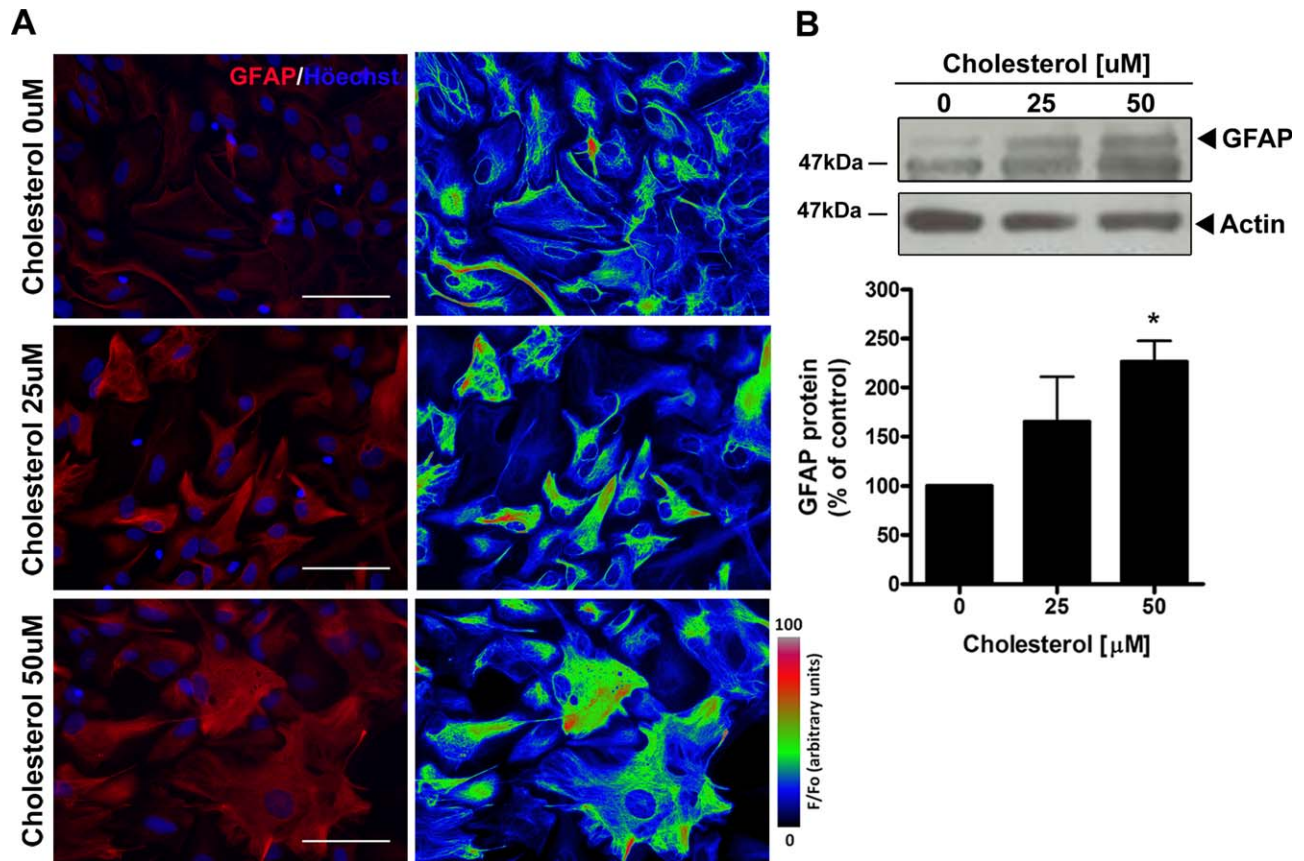


FIGURE 2: Cholesterol induces astrocyte activation. Astrocytes were incubated with 25 and 50 μM cholesterol for 48 h. **A:** Left panels: astrocytes were stained with GFAP (red) and Höchst (blue); Right panels: fluorescence signals were converted to rainbow RGB for intensity analysis. 20 \times . Scale bar: 80 μm . **(B)** The levels of GFAP protein were detected by western blotting. Densitometric analysis of GFAP bands were normalized with corresponding β -actin levels. $n = 4$; * $P < 0.01$ vs. control.

processes of the astrocytes. As a marker for the glycosphingolipids components of lipid rafts, we used CTB, which specifically binds the ganglioside GM1 (Kenworthy et al., 2000; Orlandi and Fishman, 1998). We found that cholesterol upregulates the CTB immunosignal that corresponds to sites where cholesterol was stained with filipin (Fig. 1B).

Cholesterol-Induced Astrocyte Activation

Cholesterol exposure induced changes in astrocyte morphology that were characterized by immunofluorescence staining of the intermediate filament protein GFAP (Fig. 2A). Control astrocytes exhibited stellate processes and a polygonal morphology typical of monolayer astrocyte cultures. After cholesterol exposure a significant dose-response increase (50 and 100%) in GFAP protein levels were observed, indicating an activated astrocyte state (Fig. 2B).

Cholesterol Content Modulates the Levels of APP

Despite extensive studies on the role of cholesterol in APP processing in neurons and the well-established connections between aberrant cholesterol trafficking and A β production in the brain (Burns et al., 2003), we decided to assess whether

cholesterol accumulation also affects the APP metabolism in astrocytes. We found a significant two- and three-fold increase in APP levels after exposure to 25 or 50 μM cholesterol, respectively, as determined by immunocytochemistry and western blotting. The distribution of APP was significantly higher in soma but also notably increased rounded the cells (Fig. 3A,B). To further analyze, the cholesterol-dependent modulation of APP levels, we incubated astrocytes with lovastatin in serum-free media to inhibit the endogenous synthesis of cholesterol and reduce the astrocyte cholesterol content. We analyzed in control astrocytes the effect of serum withdrawal on APP levels and observed that after 24 h, there is a significant increase of APP. However, after 48 h the APP levels were similar in the presence or absence of serum (data not shown). At this time, we observed that lovastatin decreased $\sim 25\%$ of the APP levels compared with the controls (Fig. 3C).

Cholesterol-Induced APP Expression Is Prevented by Antioxidants

To determine a potential mechanism involved in cholesterol-induced APP overexpression, we measured ROS production

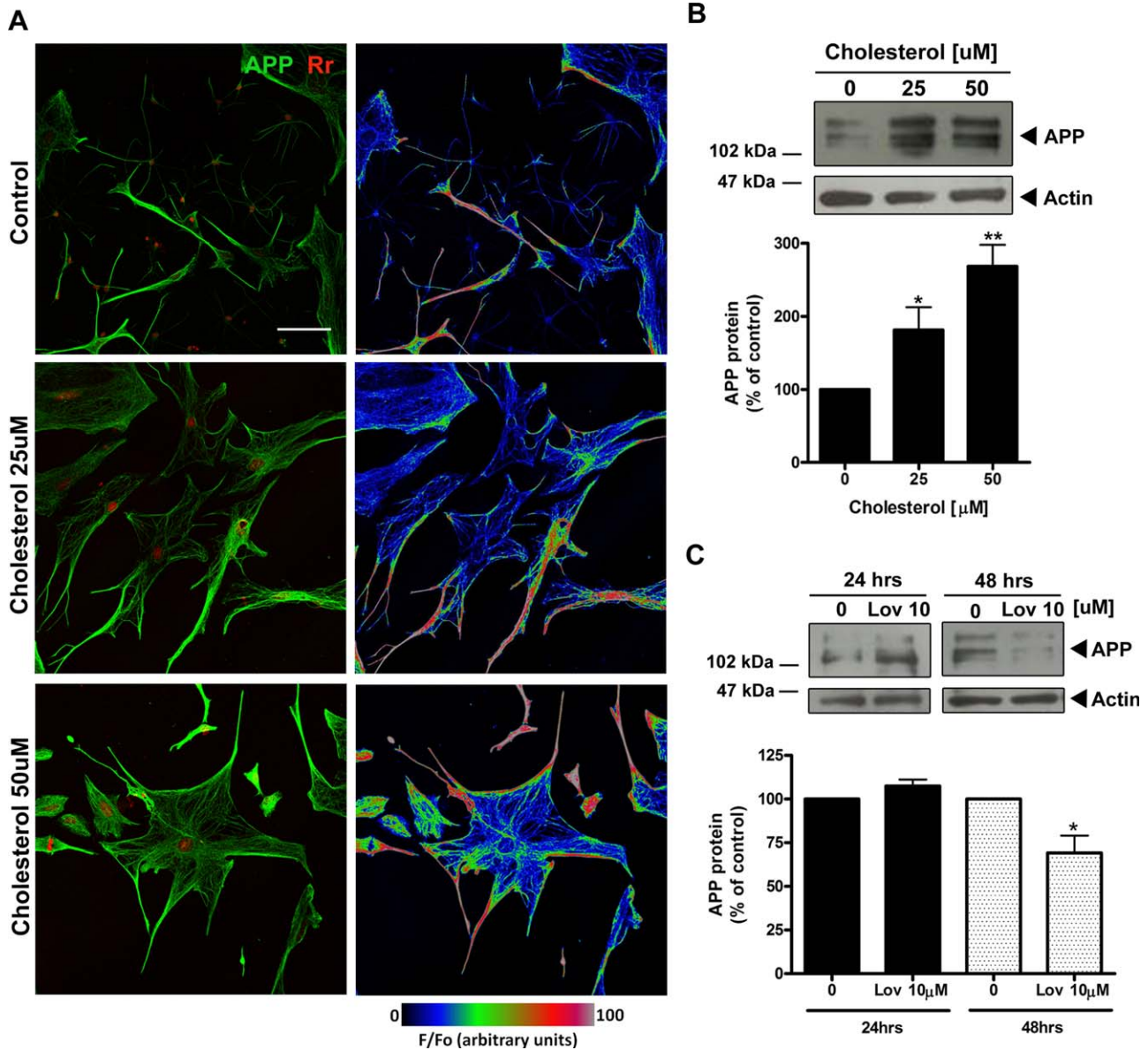


FIGURE 3: Effect of cholesterol on APP protein levels. Astrocytes were incubated with 25 or 50 μM cholesterol for 48 h. **A:** Left panels: immunofluorescence against APP (green) and nuclei (Rr, radiant red); Right panels: fluorescence signals were converted to rainbow RGB for intensity analysis. 20 \times . Scale bar: 80 μm . **B:** APP protein levels were detected by western blotting and normalized to corresponding levels of β -actin. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs. control ** $P < 0.01$ vs. control. **C:** Astrocytes were treated with 10 μM Lovastatin for 24 and 48 h in serum free media. APP was detected by western blotting and densitometric analysis of APP bands were normalized to corresponding β -actin bands. $n = 4$. * $P < 0.01$ vs. control.

and the effects of Euk-134 antioxidant. As shown in Fig. 4, cholesterol increased the number of dihydroethidium positive cells, whereas Euk-134 antioxidant prevented this increase (Fig. 4A,B). To further analyze the involvement of cholesterol in ROS production we also determined the increase of RDH fluorescence and we obtained similar results (Fig. 4C). When astrocytes were incubated in the presence of cholesterol and the antioxidant Euk-134, the APP levels were significantly reduced (Fig. 4D). This indicates that the redox environment produced by high cholesterol plays an important role in APP expression.

Cholesterol Increases BACE-1 Levels and Promotes Its Association with APP

BACE-1 expression was detected in control astrocytes and is known to be upregulated in AD models and after an injury (Hartlage-Rubsamen et al., 2003; Rossner et al., 2001). The effects of cholesterol on APP rise were also accompanied with a significant two-fold increase in BACE-1 levels when cholesterol was added at 50 μM (Fig. 5A,B). The cellular distribution of BACE-1 was observed, and similar to that described in neuronal cultures, it displayed a scattered pattern near the cellular nuclei (Fig. 5A; Patil et al., 2006). It is known that BACE-1-mediated APP

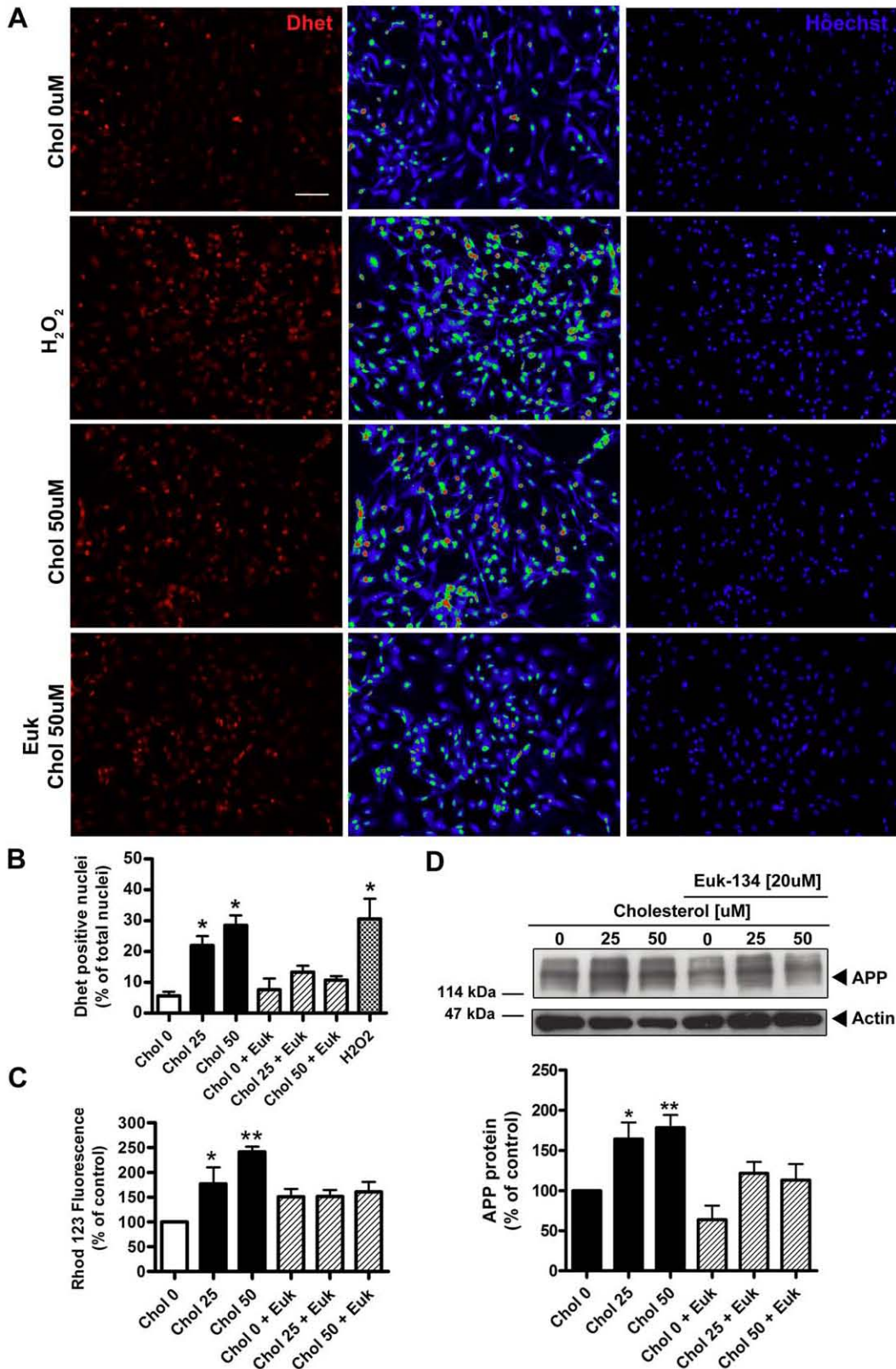


FIGURE 4: The effect of cholesterol on APP protein level is modulated by induced ROS formation. **A:** Astrocytes were incubated with 50 μ M cholesterol for 48 h. ROS generation was detected using the dihydroethidium (Dhet) assay. Left panels: dihydroethidium fluorescence in red; Middle panels: fluorescence signals were converted to rainbow RGB for intensity analysis; Right panels: nuclei stained with Hoechst. 10 \times . Scale bar: 80 μ m. **B:** Astrocytes were incubated with 25 and 50 μ M cholesterol for 48 h, and/or 20 μ M Euk-134 (for 24 h). Positive nuclei to dihydroethidium were detected and counted. Quantification represents the percentage of Dhet positive nuclei relative to total nuclei stained with Hoechst. The nuclei were counted from six microscope fields per experiment. As a positive control for ROS formation, astrocytes were incubated with 25 μ M H₂O₂ for 2 h, $n = 4$. * $P < 0.01$ vs. control. **C:** Astrocytes were incubated with 25 and 50 μ M cholesterol for 48 h, and/or 20 μ M Euk-134 (for 24 h). RDH fluorescence was quantified and presented as the percentage relative to control cells exposed to vehicle. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs. control ** $P < 0.01$ vs. control. **D:** APP levels were detected by western blotting after cholesterol treatment in the absence or presence of antioxidant Euk-134. Densitometric analysis of APP. $n = 3-4$. * $P < 0.05$ vs. control ** $P < 0.01$ vs. control.

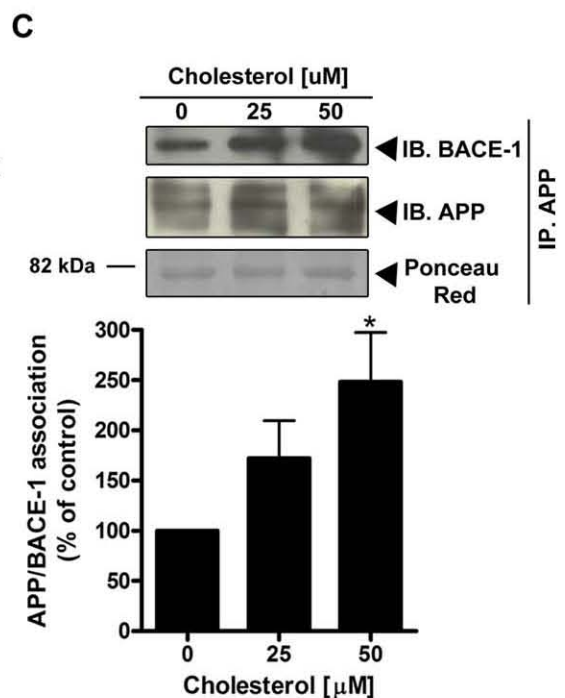
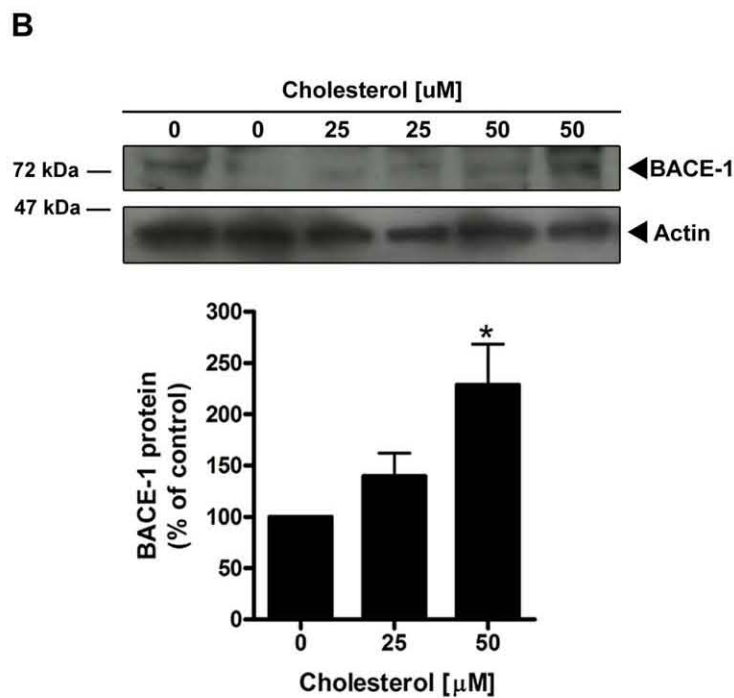
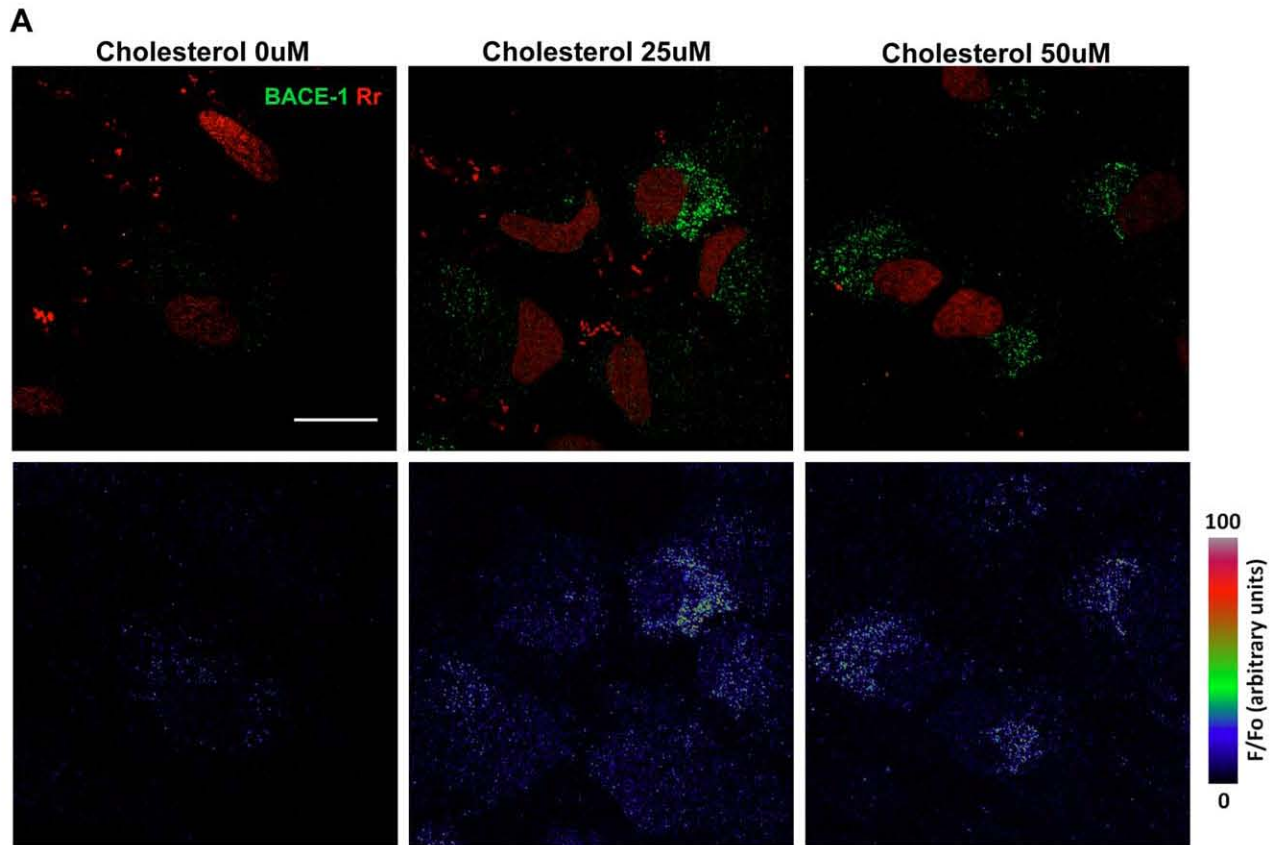


FIGURE 5: Cholesterol modulates BACE-1 protein levels and its interaction with APP. Astrocytes were incubated with 25 or 50 μ M cholesterol for 48 h. **A**: Top panels: immunofluorescence against BACE-1 (green) and nuclei (Rr, radiant red); Bottom panels: fluorescence signals were converted to rainbow RGB for intensity analysis. 100 \times . Scale bar: 20 μ m. **B**: BACE-1 levels were detected by western blotting and normalized to corresponding β -actin levels. $n = 4$. * $P < 0.01$ vs. control. **C**: A coimmunoprecipitation assay was performed. Top row: APP was immunoprecipitated and BACE-1 was detected by western blotting; middle row: APP was immunoprecipitated and APP was detected by western blotting; bottom row: a random protein stained with Ponceau red was used as a loading control. Quantification was completed by normalizing the top line with the corresponding middle line. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs. control.

processing in neurons is favored in cholesterol-enriched lipid membranes. To investigate if the association of APP with BACE-1 was increased in cholesterol-loaded astrocytes, we conducted co-immunoprecipitation experiments, which showed that effectively cholesterol promotes APP/BACE-1 interaction (Fig. 5C).

Cholesterol Modulates the Amyloidogenic Process of APP

BACE-1 cleaves APP at the major Asp+1 site to generate C-99, which is subsequently cleaved by γ -secretase in the amyloidogenic pathway of APP processing. Thus, we next determined whether the upregulation of BACE-1 in response to cholesterol incubation affected APP processing at the β -secretase site. Similar to previously reported results, we found that the C-99 fragment levels were significantly higher in the cholesterol-treated astrocytes compared to the controls (Fig. 6A). In view that cholesterol seems to upregulate the amyloidogenic route, we also analyzed the content of A β peptides. A slight but significant increase was observed in the secretion of A β 40 while there were no changes in A β 42 (Fig. 6C). Because astrocytes have robust A β uptake and degradation systems, we also measured the intracellular contents of A β peptides after cholesterol exposure. Although we did not observe modification in the astrocyte contents of A β at any time in this study (Fig. 6D), we found a significant reduction of the sAPP α fragment, which is the secreted product of the non-amyloidogenic metabolism of APP, as well as a significant increase in the secreted fragment sAPP β , product of BACE-1 activity (Fig. 6B). These results are in agreement with the cholesterol-promoted increase of the amyloidogenic processing of APP.

Discussion

Our study focused on the role of increased cholesterol concentrations in the amyloidogenic processing of the APP in primary astrocytes. Activated astrocytes are always present in the brains of patients with AD and in transgenic models (Carter et al., 2012; Kamphuis et al., 2012; Pekny et al., 2014). In fact, reactive gliosis appears to precede the characteristic lesions of AD (Wharton et al., 2009), suggesting the involvement of glial activation in the expression of the disease markers. Many studies attempting to elucidate the involvement of astrocytes in AD pathology have primarily focused on the interaction between amyloid plaques and perturbed astrocyte homeostasis. In this regard, researchers have proposed that it is via neuroinflammation that metabolic dysfunction of astrocytes contributes to A β pathology, by reducing A β clearance. In this study, we found that high cholesterol induces astrocytes activation and triggers APP expression and metabolism. Our findings also show that modifications of cholesterol contents regulate the association

between APP and BACE-1. In addition, we found that astrocytes exposed to the cholesterol-lowering compound lovastatin have significantly reduced APP levels.

The cholesterol hypothesis in AD is still controversial considering that, significant changes in cholesterol levels in serum/plasma and in the brains of AD patients have not been consistently found (for review see Wood et al., 2014). However, changes in location of membrane cholesterol domains may take place with no or minimal change in cholesterol levels in the brain. Cholesterol alters the lipid microenvironment, thus, cholesterol binding to neuronal APP in membranes could provide an optimal physico-chemical environment for the activity of BACE-1, and therefore activate the amyloidogenic pathway (Wood et al., 2014). In this regard, we found that cholesterol increased the lipid rafts-like content, observed by visualizing rafts with the GM1 marker, CTB. Although it has been reported that the CTB binding cannot be completely specific for GM1 (Blank et al., 2007), our results demonstrated an increase in the CTB signal after cholesterol loading that was particularly strong for those sites colabeled with filipin.

Lipid raft formation has been previously reported to promote the membrane association of APP, presenilin, and BACE-1 and to increase A β production in neurons (Ehehalt et al., 2003; Marquer et al., 2011; Riddell et al., 2001; Vettrivel et al., 2004; Wahrle et al., 2002). Similarly, we found that cholesterol treatment of astrocytes induced a notable increase in the APP-derived C-99 peptide and the sAPP β both fragments derived from BACE-1 activity, demonstrating the promotion of the amyloidogenic processing. However, we detected only a slight secretion of A β 40 into the medium for this cell type. This apparent discrepancy probably arises because primary astrocytes have a rapid uptake system and an efficient degradation mechanism for this peptide (Nielsen et al., 2010). However, the astrocyte clearance function can also be compromised in AD (Mulder et al., 2012), and a significant increase in secreted A β might occur in this pathological situation. However, the small changes detected in A β 40/42 could be because astrocytes are able to produce and secrete different patterns of N-terminally truncated A β variants that were not detected in this study (Oberstein et al., 2014). Finally, it is possible that in the present model, cholesterol promoted the interaction between BACE-1 and APP without affecting the activity of γ -secretase to complete the A β production. As reported in studies on neurons, (Ferrera et al., 2008; Mendoza-Oliva et al., 2013), exposure of astrocytes to free cholesterol was associated with ROS production which apparently is involved in cholesterol-induced APP expression because it was completely prevented in the presence of the potent antioxidant Euk-134.

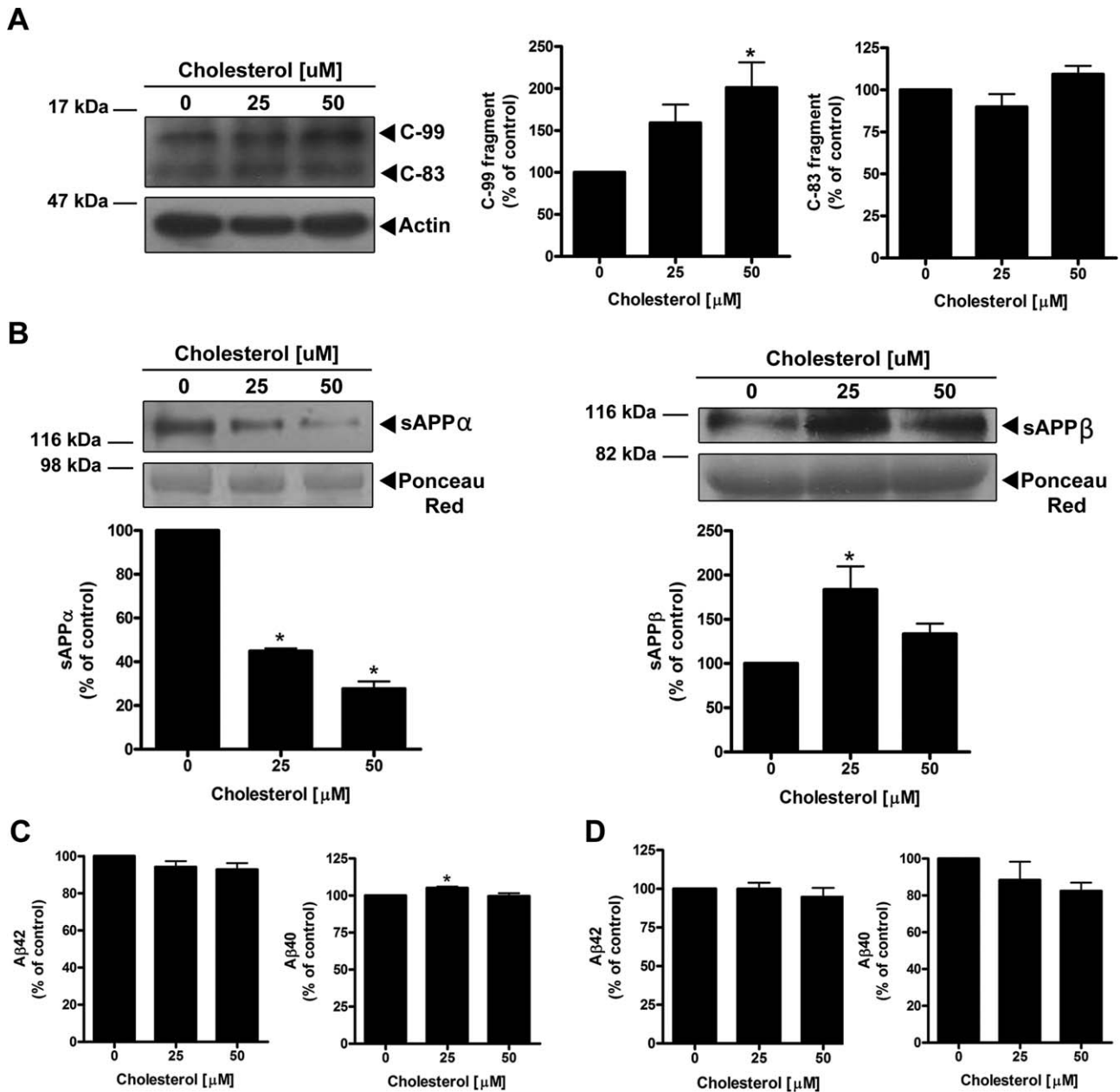


FIGURE 6: Cholesterol modulates the amyloidogenic and nonamyloidogenic processing of APP. Astrocytes were incubated with 25 or 50 μ M cholesterol for 48 h. **A:** Representative blot and densitometric analysis of the C-99 and C-83 fragments. $n = 3$. $*P < 0.05$ vs. control. **B:** Secreted sAPP α (left) and sAPP β (right) were detected by western blotting: for sAPP α and sAPP β 30 and 90 μ g of protein were loaded, respectively. For densitometric analysis, sAPP α and sAPP β bands were normalized with a random protein stained with Ponceau red. sAPP α : $n = 5$ and $*P < 0.01$ vs. control. sAPP β : $n = 4$ and $*P < 0.05$. **C:** Secreted A β 42 and A β 40 peptides were detected by ELISA assay. A β 42: $n = 4$; A β 40: $n = 5$ and $*P < 0.05$ vs. control. **D:** Intracellular A β 42 and A β 40 peptides were detected by ELISA assay, A β 42, and A β 40: $n = 4$.

APP synthesis, trafficking, and cleavage are highly regulated and complex processes. From our study, it is important to mention that favoring the amyloidogenic processing of APP cannot only increase A β production, but also decreases the content of other peptides derived from the nonamyloidogenic route, including the sAPP α . It is known that the sAPP α fragment is generated by the action of α -secretase enzyme, which is usually located outside the cholesterol-enriched

patches in neuronal membranes (Riddell et al., 2001). The reduction of sAPP α also plays an independent role in causing pathological consequences to the brain for APP cleavage products other than A β (Kuhn et al., 2010) and astrocytes may contribute to this decrease. APP shares similar amino acid sequence with the protein APLP-2, particularly in the N-terminal part of the transmembrane domain. However, our results showed that the effects of cholesterol were also

accompanied by changes in the production of C-terminal fragment, C-99, and sAPP β peptide, demonstrating the role of cholesterol on APP processing. Based on our findings we propose a bidirectional mode for cholesterol action: (1) disturbances in astrocyte cholesterol will induce oxidative stress and APP upregulation, and (2) through the promotion of lipid raft formation, cholesterol would favor the association of APP and BACE-1, resulting in the activation of the amyloidogenic route. In both cases, astrocytes activated by cholesterol might be a factor that contributes to the amyloid load in the brain of an AD patients. It is interesting that astrocytes are deeply in contact with synapses and blood vessels. Thus, it is feasible that local production of A β by astrocytes may be toxic to these brain components, which are both highly involved in the physiopathology of this disease.

In conclusion, these data supports the hypothesis that cholesterol increase in astrocytes is an important factor for promoting APP expression and metabolism, and research efforts will need to account for the mechanisms leading to cholesterol dysfunction in this cell type. This topic may have important implications for our understanding of the pathogenesis of this neurodegenerative disease. The participation of astrocytes in A β production may be a potential target for the treatment of AD.

Acknowledgment

Grant sponsor: CONACYT, México; Grant number: 166482; Grant sponsor: PAPIIT; Grant number: IN204212; Grant sponsor: UNAM. E A-M received a fellowship from CONACYT, México for her PhD studies in the program: Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

The authors thank Patricia Ferrera for excellent technical assistance and Guadalupe Domínguez for valuable support in the astrocyte primary cultures.

References

Avila-Muñoz E, Arias C. 2014. When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 18C:29–40.

Blank N, Schiller M, Krienke S, Wabnitz G, Ho AD, Lorenz HM. 2007. Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol Cell Biol* 85:378–382.

Bornig H, Geyer G. 1974. Staining of cholesterol with the fluorescent antibiotic "filipin". *Acta Histochem* 50:110–115.

Burns M, Gaynor K, Olm V, Mercken M, LaFrancois J, Wang L, Mathews PM, Noble W, Matsuoka Y, Duff K. 2003. Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances β -amyloid production in vivo. *J Neurosci* 23:5645–5649.

Burton T, Liang B, Dibrov A, Amara F. 2002. Transcriptional activation and increase in expression of Alzheimer's β -amyloid precursor protein gene is mediated by TGF- β in normal human astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 295:702–712.

Busciglio J, Gabuzada AH, Matsudaira P, Yankner BA. 1993. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2092–2096.

Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC. 2001. BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4:233–234.

Carter SF, Schöll M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Långström B, Nordberg A. 2012. Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: A multitracer PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med* 53:37–46.

De Strooper B. 2003. Aph1, Pen-2 and Nicastrin with Presenilin generate an active γ -Secretase complex. *Neuron* 38:9–12.

De Strooper B, Annaert W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113:1857–1870.

Diehlmann A, Ida N, Weggen S, Grunberg J, Haass C, Masters CL, Bayer TA, Beyreuther K. 1999. Analysis of presenilin 1 and presenilin 2 expression and processing by newly developed monoclonal antibodies. *J Neurosci Res* 56:405–419.

Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113–123.

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, Hartmann T. 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5856–5861.

Ferrera P, Mercado-Gómez O, Silva-Aguilar M, Valverde M, Arias C. 2008. Cholesterol potentiates β -amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: Involvement of oxidative stress. *Neurochem Res* 33:1509–1517.

Glenner GG, Wong CW. 1984. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885–890.

Golub T, Wacha S, Caroni P. 2004. Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* 14:542–550.

Gomes A, Fernandes E, Lima JL. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 31:45–80.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Chuchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1088–1093.

Hartlage-Rubsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gartner U, Franke H, Stahl T, Gunther A, Schliebs R, Penkowa M, Bigl V, RoBner S. 2003. Astrocytic Expression of the Alzheimer's Disease β -Secretase (BACE1) Is Stimulus-Dependent. *Glia* 41:169–179.

Iwatsubo T. 2004. The γ -secretase complex: Machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol* 14:379–383.

Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356:1627–1631.

Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, Kooijman L, Sluijs JA, Jansen AH, Vermeer M, de Groot LR, Smith VD, Rangarajan S, Rodríguez JJ, Orre M, Hol EM. 2012. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One* 7:e42823.

- Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin SG. 2004. Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:3801–3809.
- Kenworthy AK, Petranova N, Edidin M. 2000. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell* 11:1645–1655.
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: Longitudinal, population based study. *BMJ* 322:1447–1451.
- Kodam A, Maulik M, Peake K, Amritraj A, Vetrivel KS, Thinakaran G, Vance JE, Kar S. 2010. Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia* 58:1267–1281.
- Koo EH, Squazzo SL. 1994. Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269:17386–17389.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020–3032.
- Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE. 1998. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain $A\beta$ 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252:711–715.
- LeBlanc AC, Papadopoulos M, Bélair C, Chu W, Crosato M, Powell J, Goodyer CG. 1997. Processing of amyloid precursor protein in human primary neuron and astrocyte cultures. *J Neurochem* 68:1183–1190.
- Lee VM, Quinn PA, Jennings SC. 2003. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* 41:925–931.
- Levin-Allerhand JA, Lominska CE, Smith JD. 2002. Increased amyloid levels in APPSWE transgenic mice treated chronically with a physiological high-fat high-cholesterol diet. *J Nutr Health Aging* 6:315–319.
- Lucero HA, Robbins PW. 2004. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys* 426:208–224.
- Marquer C, Devauges V, Cossec J-C, Liot G, Lécart S, Saudou F, Duyckaerts C, Lévêque-Fort S, Potier M-C. 2011. Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J* 25:1295–1305.
- Mendoza-Oliva A, Ferrera P, Arias C. 2013. Interplay between cholesterol and homocysteine in the exacerbation of amyloid- β toxicity in human neuroblastoma cells. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12:842–848.
- Miake H, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Levesque L, Fraser PE, St.-George Hyslop PH, Mzusaawa H, Uchihara T. 1999. Glial expression of presenilin epitopes in human brain with cerebral infarction and in astrocytoma. *Acta Neuropathol* 98:337–340.
- Morán J, Patel AJ. 1989. Stimulation of the N-methyl D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Res* 486:15–25.
- Mulder SD, Veerhuis R, Blankenstein MA, Nielsen HM. 2012. The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid- β clearance by adult human astrocytes. *Exp Neurol* 233:373–379.
- Nadler Y, Alexandrovich A, Grigoriadis N, Hartmann T, Rao KSJ, Shohami E, Stein R. 2008. Increased Expression of the γ -Secretase Components Presenilin-1 and Nicastrin in Activated Astrocytes and Microglia Following Traumatic Brain Injury. *Glia* 56:552–567.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC. 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:663–674.
- Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N, Younkin SG, Cruchaga C, Kauwe JS, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huettelman MJ, Myers AJ, Barmada MM, Demirci FY, Baldwin CT, Green RC, Rogava E, St George-Hyslop P, Arnold SE, Barber R, Beach T, Bigio EH, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Cairns NJ, Carlson CS, Carney RM, Carroll SL, Chui HC, Clark DG, Corneveaux J, Cotman CW, Cummings JL, DeCarli C, DeKosky ST, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson DW, Ellis WG, Faber KM, Fallon KB, Farlow MR, Ferris S, Frosch MP, Galasko DR, Ganguli M, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Gilman S, Giordani B, Glass JD, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Head E, Honig LS, Hulette CM, Hyman BT, Jicha GA, Jin LW, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Koo EH, Kowall NW, Lah JJ, Levey AI, Lieberman AP, Lopez OL, Mack WJ, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Parisi JE, Perl DP, Peskind E, Petersen RC, Poon WW, Quinn JF, Rajbhandary RA, Raskind M, Reisberg B, Ringman JM, Roberson ED, Rosenberg RN, Sano M, Schneider LS, Seeley W, Shelanski ML, Slifer MA, Smith CD, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Williamson J, Woltjer RL, Cantwell LB, Dombroski BA, Beekly D, Lunetta KL, Martin ER, Kamboh MI, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Hakonarson H, Kukull WA, Foroud TM, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Schellenberg GD. 2011. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:436–441.
- Nielsen HM, Mulder SD, Beliën JA, Musters RJ, Eikelenboom P, Veerhuis R. 2010. Astrocytic $A\beta$ 1-42 uptake is determined by $A\beta$ -aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia* 58:1235–1246.
- Oberstein TJ, Spitzer P, Klafki HW, Linning P, Neff F, Knölker HJ, Lewczuk P, Wiltfang J, Kornhuber J, Maler JM. 2014. Astrocytes and microglia but not neurons preferentially generate N-terminally truncated $A\beta$ peptides. *Neurobiol Dis* 73C:24–35.
- Orlandi PA, Fishman PH. 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin-evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141:905–915.
- Patil S, Sheng L, Masserang A, Chan C. 2006. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci Lett* 406:55–59.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett* 565:30–38.
- Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonomic MD, López OL, Klunk W, Hyman BT, Gómez-Isla T. 2013. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* 136:2510–2526.
- Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE. 2001. A cholesterol lowering drug reduces β -amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8:890–899.
- Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C. 2001. Compartmentalization of β -secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* 11:1288–1293.
- Rossner S, Apelt J, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. 2001. Neuronal and glial β -secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology. *J Neurosci Res* 64:437–446.
- Rossner S, Lange-Dohna C, Zeitschel U, Perez-Polo JR. 2005. Alzheimer's disease β -secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J Neurochem* 92:226–234.
- Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carrasquillo MM, Lambert JC, Harold D, Schrijvers EM, Ramirez-Lorca R, Debette S, Longstreth WT Jr, Janssens AC, Pankratz VS, Dartigues JF, Hollingworth P, Aspelund T, Hernandez I, Beiser A, Kuller LH, Koudstaal PJ, Dickson DW, Tzourio C, Abraham R, Antunez C, Du Y, Rotter JI, Aulchenko YS, Harris TB, Petersen RC, Berr C, Owen MJ, Lopez-Arrieta J, Vardarajan BN, Becker JT, Rivadeneira F, Nalls MA, Graff-Radford NR, Campion D, Auerbach S, Rice K, Hofman A, Jonsson PV, Schmidt H, Lathrop M, Mosley TH, Au R, Psaty BM, Uitterlinden AG, Farrer LA, Lumley T, Ruiz A,

- Williams J, Amouyel P, Younkin SG, Wolf PA, Launer LJ, Lopez OL, van Duijn CM, Breteler MM; CHARGE Consortium; Gerad1 Consortium; EAD11 Consortium. 2010. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303:1832–1840.
- Shie F-S, LeBoeuf RC, Jin L-W. 2003. Early intraneuronal A β deposition in the hippocampus of APP transgenic mice. *NeuroReport* 14:123–129.
- Shiraishi H, Marutani T, Wang H-Q, Maeda Y, Kurono Y, Takashima A, Araki W, Nishimura M, Yanagisawa K, Komano H. 2006. Reconstitution of γ -secretase by truncated presenilin (PS) fragments revealed that PS Cterminal transmembrane domain is critical for formation of γ -secretase complex. *Genes Cells* 11:83–93.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 39:115–123.
- Siman R, Card JP, Nelson RB, Davis LG. 1989. Expression of β -amyloid precursor protein in reactive astrocytes following neuronal damage. *Neuron* 3: 275–285.
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker IIIJC, Liu H, Landers T, Gross DR. 1994. Induction of Alzheimer-like β -amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126:88–94.
- Thal DR, Schultz C, Dehghani F, Yamaguchi H, Braak H, Braak E. 2000. Amyloid β -protein (A β)-containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated A β deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathol* 100:608–617.
- Uryu K, Laurer H, McIntosh T, Praticò D, Martinez D, Leight S, Lee VM, Trojanowski JQ. 2002. Repetitive mild brain trauma accelerates A β deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 22:446–454.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G Citron M. 1999. β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735–741.
- Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, Wong PC, Xu H, Thinakaran G. 2004. Association of γ -secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 279:44945–44954.
- Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE. 2002. Cholesterol-dependent γ -secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 9:11–23.
- Wharton SB, O'Callaghan JP, Savva GM, Nicoll JA, Matthews F, Simpson JE, Forster G, Shaw PJ, Brayne C, Ince PG, MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group. 2009. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 27:465–473.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439–1443.
- Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP. 2014. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem* 129:559–572.
- Xiu J, Nordberg A, Qi X, Guan ZZ. 2006. Influence of cholesterol and lovastatin on α -form of secreted amyloid precursor protein and expression of α 7 nicotinic receptor on astrocytes. *Neurochem Int* 49:459–465.
- Young JM, Lee RKK, Jhaveri S, Wurtman RJ. 1999. Intracellular and cell-surface distribution of amyloid precursor protein in cortical astrocytes. *Brain Res Bull* 50:27–32.



Review

When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease



Evangelina Avila-Muñoz, Clorinda Arias*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2014
 Received in revised form 3 July 2014
 Accepted 21 July 2014
 Available online 28 July 2014

Keywords:

Astrocytes
 Alzheimer's disease
 Amyloid β metabolism
 Cytokines
 Neurodegeneration
 Neuroinflammation

ABSTRACT

A growing body of research suggests that astrocytes play roles as contributors to the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Several lines of evidence propose that activated astrocytes produce and release proinflammatory molecules that may be critical for the generation of amyloid- β peptide (A β). However, accumulating evidence indicates that A β may activate astrocytes, which leads to an increase in cytokines that has been suggested to be a causative factor in the cognitive dysfunction of AD; thus, a vicious circle may be created. Intrinsic inflammatory mechanisms may provide a regulatory system that is capable of influencing the neuronal microenvironment that affects neuronal survival. In this article, we address the evidence surrounding the interactions of dysfunctional astrocytes with neighboring neurons that may initiate a cascade of events that culminates with neuronal injury and the expression of the hallmark lesions of AD. Comprehensive knowledge of the molecular mechanisms underlying the participation of astrocytes in neurodegeneration could aid the development of therapies to restore proper astrocyte function that can be used in AD patients to prevent or alleviate the progression of the disease in a more efficient and comprehensive manner.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	30
2. Emerging roles of astrocytes in the brain	30
3. Astrocytic participation in cerebrovascular alterations in AD	30
4. Astrocytes and A β metabolism	31
5. A β clearance by astrocytes	32
6. Neuroinflammation: A link between astrocytes and AD	32
7. Other relevant biochemical pathways implicated in AD triggered by astrocytes	34
7.1. Calcium signaling	34
7.2. Excitotoxicity	35
7.3. Acetylcholine dysfunction	35
7.4. Fatty acids and astrocytic activation	36
8. Conclusion	37
Acknowledgments	37
References	37

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 92 15; fax: +52 55 56 22 91 82.
 E-mail address: carias@unam.mx (C. Arias).

1. Introduction

Dementia is a condition that results from a variety of brain diseases whose incidences have increased with the increase in life expectancy. The global incidence of dementia is estimated to be 35.6 million and is projected to nearly double every 20 years to reach 65.7 million in 2030. Alzheimer's disease (AD) constitutes 60 to 70% of dementia cases (WHO, 2012). Clinically, AD is defined by the progressive decline of memory, and histopathologically characterized by the presence of extracellular aggregates of amyloid- β (A β) peptide and intraneuronal neurofibrillary tangles that are composed of hyperphosphorylated tau protein. Aging is the main risk factor for late-onset AD, but it is possible that multiple neuronal abnormalities occur simultaneously in the brain and lead to the progressive disconnection of neuronal networks and the appearance of clinical symptoms. These alterations include genetic polymorphisms, epigenetic modifications, abnormal immune or inflammatory responses, traumatic brain injury, oxidative stress and mitochondrial dysfunction (Hardy, 1997; Podlesniy et al., 2013; Rao et al., 2012; Small, 1998). According to the amyloid cascade hypothesis, the deposition of A β in the brain initiates the pathological events that result in inflammation, synaptic dysfunction, synaptic loss and neuronal death (Walsh and Selkoe, 2004). Local and chronic neuroinflammation are constant features of AD brains, which are characterized by activated microglia and astrocytes that surround amyloid plaques and neurons that carry neurofibrillary tangles (Sastre et al., 2006).

2. Emerging roles of astrocytes in the brain

Astrocytes are the most abundant glial cells in the central nervous system (CNS) and play multiple roles in organizing and maintaining brain structure and function (Maragakis and Rothstein, 2006; Sofroniew and Vinters, 2010). Astrocytes dynamically modulate information processing and signal transmission, regulate neural and synaptic plasticity and provide trophic and metabolic support to neurons (Blackburn et al., 2009; Halassa and Haydon, 2010; Henneberger et al., 2010; Perea et al., 2009). Additionally, astrocytes regulate local CNS blood flow in response to changes in neuronal activity (Koehler et al., 2009). Indeed, a number of molecules, such as prostaglandins (PGE), nitric oxide (NO) and arachidonic acid (AA), that increase or decrease CNS blood vessel diameter and blood flow are produced by astrocytes (Gordon et al., 2007; Iadecola and Nedergaard, 2007).

Unlike neurons, astrocytes do not propagate action potentials along their processes; however, astrocytes do exhibit regulated increases in intracellular calcium concentrations [Ca^{2+}]_i that represent a form of astrocytic excitability (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990; Nedergaard et al., 2003; Seifert et al., 2006). Increases in astrocytic [Ca^{2+}]_i are of functional significance in astrocyte/astrocyte and astrocyte/neuron communication. Other physiological functions of astrocytes include the maintenance of fluid, ion, pH, and neurotransmitter homeostasis in the synaptic space (Sattler and Rothstein, 2006; Seifert et al., 2006; Simard and Nedergaard, 2004; Zador et al., 2009). After the reuptake of neurotransmitters into astrocytes, the neurotransmitters are metabolized and transformed into precursors that can be returned to the neurons to be converted into active neurotransmitters. In response to changes in neuronal synaptic activity, astrocytes are able to release gliotransmitters, such as purines and glutamate that affect neuronal excitability (Halassa et al., 2007; Nedergaard et al., 2003; Perea et al., 2009). Such evidence has given rise to the 'tripartite synapse' hypothesis, which states that astrocytes directly interact with neurons during synaptic activity in a manner that is essential for information processing in neural circuits (Araque et al.,

1999; Halassa et al., 2007; Perea et al., 2009). This concept suggests that astrocytes, in coordination with pre- and post-synaptic neuronal elements, constitute a functional synapse (Aguilhon et al., 2008). It was generally accepted that the astrocyte release of gliotransmitters is a Ca^{2+} -dependent process, but Fiocco et al. (2007) demonstrated that Ca^{2+} elevations in hippocampal astrocytes do not affect the basal miniature excitatory activity. More recent evidence on the hippocampus has confirmed that the Ca^{2+} increase in astrocytes does not affect the spontaneous or evoked excitatory action potential or short- and long-term plasticity at Schaffer collateral-CA1 synapses (Aguilhon et al., 2010). Moreover, in 2012, the same research team found that Ca^{2+} elevations alone are not sufficient for transmitter release by astrocytes, and additional factors, such as inflammatory molecules, appear to be required. Thus, astrocytes could be activated and transformed into competent gliotransmitter-releasing cells during the early stages of an inflammatory process that is associated with neurodegeneration (Aguilhon et al., 2012).

Brain damage is accompanied by astrocytic activation (Fig. 1) that is characterized by the upregulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and proliferative and morphological alterations (Kato et al., 1998; Pekny and Nilsson, 2005). Although activated astrocytes may provide neuroprotection via the release of neurotrophic factors, they also participate in inflammatory reactions by expressing pro-inflammatory molecules, such as cytokines and chemokines (Farina et al., 2007) that may participate in some neurodegenerative changes. Astrocytes throughout the entorhinal cortices of AD patients gradually accumulate A β 42 species that positively correlated with the extent of local AD histopathology (Nagele et al., 2003). Although significant progress in the understanding of the function of astrocytes in the brain has been made over the last few decades, the cellular and functional responses of astrocytes to injury during the progression of AD are not completely understood (Attwell et al., 2010; Halassa and Haydon, 2010).

3. Astrocytic participation in cerebrovascular alterations in AD

Cerebrovascular dysregulation is an important feature of AD pathology that is associated with ischemic injury and brain-blood barrier (BBB) damage (Kalaria, 2000, 1999). Epidemiological studies suggest a relationship between AD pathology and cardiovascular disease and indicate that sporadic AD represents a cerebral vascular disorder that is caused by impaired neuronal perfusion (de la Torre, 2004) and/or by the accumulation of toxic products caused by altered BBB permeability (Zlokovic, 2014). Diverse studies in humans have demonstrated in vivo hypoperfusion in AD and that brain hypoperfusion-hypoxia, silent infarcts, stroke episodes and transient ischemic or hypoxic attacks increase the risk of AD (Vermeer et al., 2003). Photon emission computed tomography has been used to identify areas of initial hypoperfusion defects in parahippocampal gyri in patients with mild cognitive impairment that converted to AD (Park et al., 2011). Computer tomography studies have also revealed changes in the cerebral blood flow in the frontal cortex, temporal cortex, hippocampus, and basal ganglia in patients with AD (Tang et al., 2012). Of all of the cerebrovascular comorbidities found, cerebral amyloid angiopathy is the most common pathological finding. This condition is present in up to 90% of AD patients (Jellinger, 2002; Vinters, 1987) and may result from a failure to eliminate A β from the cerebral vasculature (Weller et al., 2009). Astrocytes are active participants of the neurovascular unit (NVU) formed by the collective action of neurons, astrocytes, pericytes and microglia. The NVU controls BBB permeability and cerebral blood flow, which are crucial in the maintenance of brain homeostasis. The astrocytic endfeet function as a barrier between

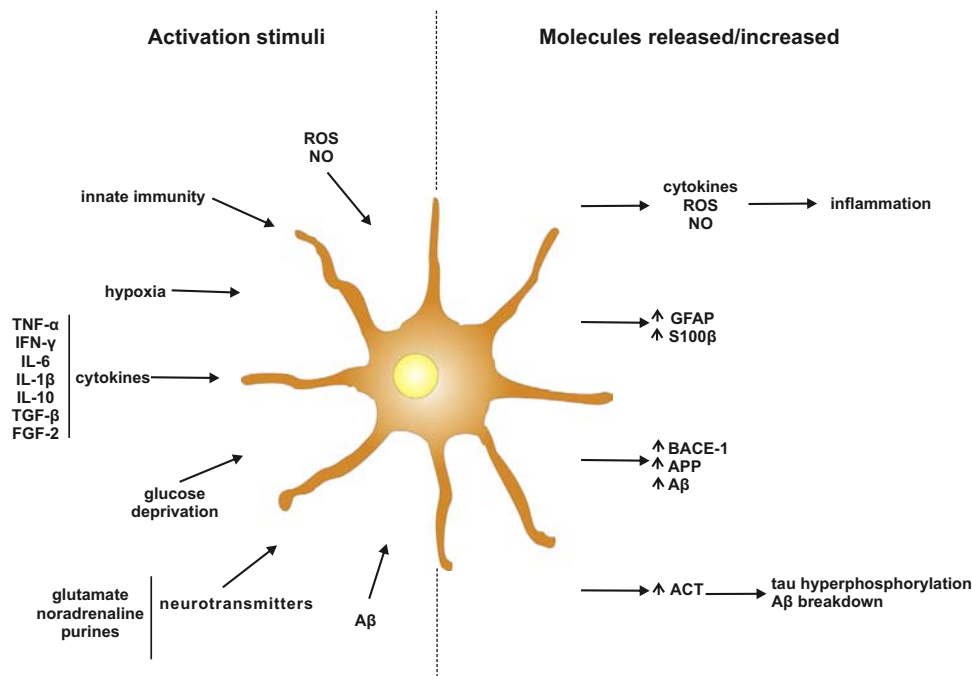


Fig. 1. Effects of astrocytic activation by different stimuli. Molecules that induce astrocytic activation and lead to increases in the expression of proteins such as GFAP and S100 β . These molecules can exacerbate the inflammatory state or promote the expression of proteins that are involved in the amyloidogenic pathway and tau hyperphosphorylation. ROS, reactive oxygen species; NO, nitric oxide; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IFN- γ , interferon- γ ; IL-6, interleukin-6; IL-1 β , interleukin 1- β ; IL-10, interleukin-10; TGF- β , tumor growth factor- β ; FGF-2, fibroblast growth factor-2; A β , amyloid beta peptide; GFAP, glial fibrillary acidic protein; S100 β , S100 calcium binding protein β ; BACE-1, β -site APP cleaving enzyme-1; APP, amyloid precursor protein; ACT, α 1-antichymotrypsin.

neurons and blood vessels and are highly specialized cellular compartments that coordinate the dynamic regulation of local blood flow in response to metabolic demands (reviewed in [Petzold and Murthy, 2011](#)). A partial blockade of perivascular fluid flow is postulated to contribute to the pathophysiology of AD ([Weller et al., 2008](#)). The deposition of amyloid protein in brain microvasculature obstructs capillary blood flow, resulting in the failure of the efflux transport, the accumulation of toxic compounds, changes in metabolic composition and, subsequently, synaptic and neuronal dysfunction ([Zlokovic, 2014](#)). Intercellular Ca²⁺ waves between astrocytes exposed to A β were also increased in frequency and amplitude in both cultured cells and in vivo ([Haughey and Mattson, 2003](#)), which could change neurovascular coupling, stimulating the release of vasoactive compounds, such as arachidonic acid and nitric oxide, which dilate or constrict neighboring arterioles. In AD, there are also changes in the proteolytic microenvironment and an astrocytic-mediated inflammatory state that may lead to the impairment of BBB integrity and may contribute to the occurrence of the cerebral microbleeds and intracerebral hemorrhages that are frequently found in sporadic AD brains ([Cordonnier and van der Flier, 2011](#)).

4. Astrocytes and A β metabolism

The A β peptide is produced by the proteolytic metabolism of the amyloid precursor protein (APP), which is an integral membrane glycoprotein that is highly expressed in the CNS. APP can undergo endoproteolytic processing by different secretases via the non-amyloidogenic pathway and, less frequently, the amyloidogenic pathway. In the non-amyloidogenic pathway, APP shedding occurs via the α -secretase proteolytic enzyme that acts on the middle of the A β domain and thus precludes the generation of A β . In the A β pathway, APP is sequentially proteolyzed by the β -secretase activity of β -site APP cleaving enzyme (BACE-1) and then by the γ -secretase enzyme within its transmembrane domain, which leads

to A β generation. The cleavage by γ -secretase is heterogeneous and gives rise to A β species that range from 37 to 43 amino acids in length. The major product generated is A β 40; although the minor A β 42 species represent only 10% of the total A β , they are believed to be the causative agents of AD because of their ability to form aggregates ([Lichtenthaler et al., 2011](#); [Selkoe, 1994](#); [Zhang et al., 2011](#)).

The vast majority of the studies of APP metabolism and A β production have focused on neurons, and the role of the astrocytes remains largely unexplored. Recent reports suggested an A β accumulation in astrocytes ([Veeraraghavalu et al., 2014](#)) and overexpression of BACE-1 in response to chronic stress that promotes A β generation ([Rossner et al., 2005](#)). The presence of activated astrocytes is constant in the brains of patients with AD and in transgenic models of the disease ([Carter et al., 2012](#); [Kamphuis et al., 2012](#); [Kraft et al., 2013](#); [Pekny et al., 2014](#)). Moreover, in samples from human brains, increases in reactive gliosis appear to precede the development of the characteristic lesions of AD ([Wharton et al., 2009](#)). In this disease, astrogliosis is focal such that the astrocytes are close to the amyloid plaques or to the diffuse deposits and surround them with dense layers of processes that form small scars ([Jarvis et al., 2007](#); [Nagele et al., 2004](#); [Pihlaja et al., 2008](#); [Thal et al., 2000](#); [Wyss-Coray, 2006](#)). Experiments have proven that the formation of A β is closely related to activated glia ([Guo et al., 2011](#)). In contrast, emerging evidence has demonstrated that the A β -mediated activation of astrocytes is characterized by morphological changes that are reflected by increases in GFAP and the neurotrophic factor S100 β ([Mrak and Griffin, 2001a,b](#); [Nagele et al., 2003](#)). A β 42 oligomers might activate astrocytes and induce dose- but not time-dependent increases in the expression of GFAP and IL-1 β and gradually decrease the viability of the astrocytes ([Hou et al., 2011](#)). In AD, activated astrocytes form halos that surround the neuritic plaques that strongly overexpress the serine protease inhibitor α 1-antichymotrypsin (ACT), which is an acute phase protein that has been suggested to inhibit β -amyloid breakdown and to be a

neurotoxin that induces the hyperphosphorylation of tau (Akiyama et al., 2000; Licastro et al., 1998; Nagele et al., 2004; Padmanabhan et al., 2006; Styren et al., 1998). Hence, the release of ACT by reactive astrocytes may potentially have roles in both the increase in amyloid plaque burden and the incidence of neurofibrillary tangles (Padmanabhan et al., 2006). Astrocytes recruited to the A β plaques likely prolong the neuroinflammatory process by secreting pro-inflammatory molecules, such as IL-1 β , NO and TNF- α , which might lead to pathogenic chronic neuroinflammation and contribute to neurodegeneration in AD (Dahlgren et al., 2002).

5. A β clearance by astrocytes

At present, the mechanisms by which A β is progressively increased in the brains of sporadic AD patients are not completely understood. Among the possible mechanisms of A β accumulation, an increase in the amyloidogenic processing of APP or, alternatively, an impairment of the clearance of A β due to decreased catabolism by proteolytic enzymes or impaired transport across the BBB are considered here. Astrocytes are involved in both the uptake and clearance of A β from the brain parenchyma into the perivascular space through the BBB (reviewed in Thal, 2012) and the degradation of A β by the following three enzymes: neprilysin (NEP) (Carpentier et al., 2002; Iwata et al., 2000), insulin-degrading enzyme (IDE) (Dorfman et al., 2010), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (Yin et al., 2006). The inhibition of NEP by angiotensin-converting enzyme-1 or endothelin-converting enzyme-2 significantly reduces A β clearance (Pihlaja et al., 2011). Accordingly, in vivo studies in the transgenic Tg2576 mouse have shown that NEP is upregulated in the reactive astrocytes that surround the A β plaques, which suggests that astrogliosis has a positive role in A β degradation. Interestingly, NEP protein levels decrease in mouse cerebral cortices with age (Apelt et al., 2003; Mohajeri et al., 2002). However, it was recently reported that NEP and scavenger receptor class B member 1 (SCARB1) expression are upregulated in normal astrocytes and that astrocytes derived from AD patients do not exhibit this increase; these findings suggest a defect of astrocyte function in AD (Mulder et al., 2012). Astrocytes are more efficient than microglia in taking up A β 42, particularly during the early stages of the progression of AD (Nielsen et al., 2010). In this respect, it has been reported that astrocytes preferably uptake oligomeric A β over fibrillar A β (Guénette, 2003; Nicoll and Weller, 2003; Nielsen et al., 2010; Shaffer et al., 1995). Using flow cytometry and confocal laser scanning microscopy, Nielsen and co-workers evaluated the binding and internalization of A β 42 by primary human fetal astrocytes and adult astrocytes that were isolated from non-demented subjects and AD patients. Although the fetal astrocytes seem to be more efficient in the uptake A β 42, no significant differences were observed between the AD and non-AD astrocytes (Nielsen et al., 2009, 2010). These findings may indicate that astrocytes in AD have altered proteolytic A β degradation abilities but not altered A β uptake competence. The efficiency of A β clearance by astrocytes is not only related to the physicochemical state of the A β peptides but also depends on complex interactions with diverse brain microenvironmental factors. In 2003, Wyss-Coray et al. (2003) showed that cultured astrocytes migrate in response to monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1), a chemokine that is present near AD lesions, and demonstrated that this migration was inhibited by interaction with immobilized A β 42. These authors also observed that astrocytes bind and degrade A β 42 when they are placed on A β -laden brain sections from a mouse model of AD (Wyss-Coray et al., 2003). Amyloid plaque-associated proteins (AAPs), such as α 1-antichymotrypsin (ACT), apolipoproteins J and E (ApoJ and ApoE) and a mixture of serum amyloid P (SAP)

and C1q (SAP-C1q), can also modify A β -uptake by human astrocytes. In the presence of SAP/C1q, the proportion of fibrillar A β increases and results in a reduction of the uptake of oligomeric A β (Nielsen et al., 2010). Another important molecule that is related to the uptake of A β by astrocytes is the lipoprotein lipase (LPL) enzyme, which is abundantly expressed in brain. In AD, LPL co-localizes with senile plaques and promotes A β uptake by acting as a bridging molecule through interactions with surface sulfated glycosaminoglycan molecules (Nishitsuji et al., 2011). The overexpression of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) increases the uptake and clearance of A β by astrocytes in a similar manner. Once internalized, A β is primarily degraded in the lysosomal pathway (Basak et al., 2012; Kim et al., 2009; Nishitsuji et al., 2011).

6. Neuroinflammation: A link between astrocytes and AD

Although inflammation is a fundamental protective immunological response, a proper balance between inflammation in response to tissue damage and immunosuppression, which favors tissue regeneration, is fundamental for controlled reactions to CNS damage. Long-lasting inflammation contributes to the pathogenesis of many chronic human diseases including AD (Medeiros and LaFerla, 2013). Epidemiological studies indicate that anti-inflammatory agents, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), have a beneficial effect on AD, indicating that inflammation exacerbates the pathology, and several reports have shown that NSAIDs are protective in transgenic AD models (McGeer and McGeer, 2003). Other studies have found that the beneficial effects of NSAIDs are due to a direct modulation of the γ -secretase activity (Lleo et al., 2004; Weggen et al., 2001, 2003; Zhou et al., 2010). It has also suggested that some of these drugs alter the β -sheet conformation of A β , thus affecting their ability to aggregate in vitro (Agdeppa et al., 2003; Thomas et al., 2001). However, long-term placebo-controlled clinical trials with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in mild-to-moderate AD patients have produced negative results. Notably, subjects who were previously exposed to naproxen were 67% less likely to experience AD onset compared with placebo. Some authors have hypothesized that the chronic use of NSAIDs may be beneficial only in the very early stages of the AD process (coinciding with initial A β deposition, microglia activation and the consequent release of pro-inflammatory mediators) (reviewed in Imbimbo et al., 2010).

A variety of inflammatory intermediaries, including IL-1 β , IL-6, TNF- α and TGF- β , are upregulated in AD patients compared to non-demented individuals, and it has been suggested that these cytokines are expressed and released by microglia, astrocytes and neurons in AD brains and contribute to the pathophysiology of the disease (Henka and O'Banion, 2010). Increased levels of IL-1 β and IL-6 (Araujo and Lapchak, 1994; Morimoto et al., 2011; Wood et al., 1993) and decreased levels of TNF- α are known to be present in the brains of individuals with AD (Lanzrein et al., 1998). Interestingly, markers of inflammation have been observed in serum and CSF long before indications of increased A β or hyperphosphorylated tau (Schuitemaker et al., 2009), and the IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-13 levels in plasma were found to inversely correlate with ventricular volume, whole brain volume or entorhinal cortex volume in AD (Leung et al., 2013). On the other hand, astrocyte-dependent expression of APP and BACE-1 has been observed in both AD patients and transgenic mouse models. Since the early 1990s, β -secretase activity (BACE-1) has been described in neural tissue, neuronal cell lines (Seubert et al., 1993) and, to a lesser extent, in astrocytes (Zhao et al., 1996). In Tg2576 mice (Rossner et al., 2001) and in the human AD brain (Hartlage-Rubsamen et al., 2003; Leuba et al., 2005; Rossner et al., 2005), reactive astrocytes around amyloid plaques were found to display BACE-1 immunoreactivity.

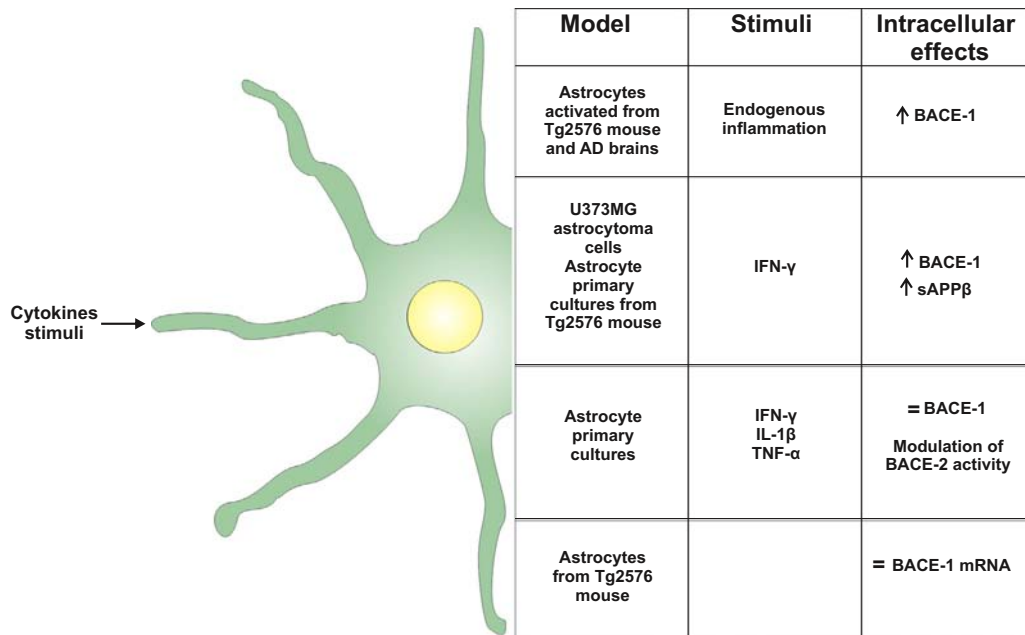


Fig. 2. Intracellular effects of cytokine exposure on astrocytes. Inflammatory environments such as those found in AD are characterized by the presence of cytokines, such as IFN-γ, IL-1β and TNF-α, which can be released by microglia or astrocytes. These molecules can stimulate other astrocytes and activate intracellular pathways that are involved in the amyloidogenic processing of APP. BACE-1, β-site APP cleaving enzyme-1; BACE-2, β-site APP cleaving enzyme-2; sAPPβ, soluble amyloid precursor protein β; IFN-γ, interferon-γ; IL-1β, interleukin 1-β; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

However, [Zhao et al. \(2007\)](#) demonstrated that BACE-1 was elevated in neurons and not in astrocytes in an APP overexpression mouse model and in AD brains. Currently, the discrepancy between the findings is thought to be due to the use of BACE-1 antibodies that were not monospecific for BACE-1. However, recent findings suggest that a certain combination of proinflammatory cytokines in AD could elevate astrocytic BACE-1 ([Zhao et al., 2011](#)). Previous studies have gathered substantial evidence

that demonstrates that astrocytes may be an important source of Aβ in the presence of inflammatory cytokines ([Figs. 2 and 3](#)). Interferon-γ (IFN-γ) in combination with TNF-α or IL-1β seems to trigger Aβ production by supporting β-secretase cleavage of the immature APP molecule ([Blasko et al., 2000](#); [Buxbaum et al., 1992](#); [Mrak and Griffin, 2001a,b](#)). The exposure of astrocytoma cells and primary astrocytes from transgenic AD mice to IFN-γ induces rapid and robust increases in BACE-1 and the amyloidogenic

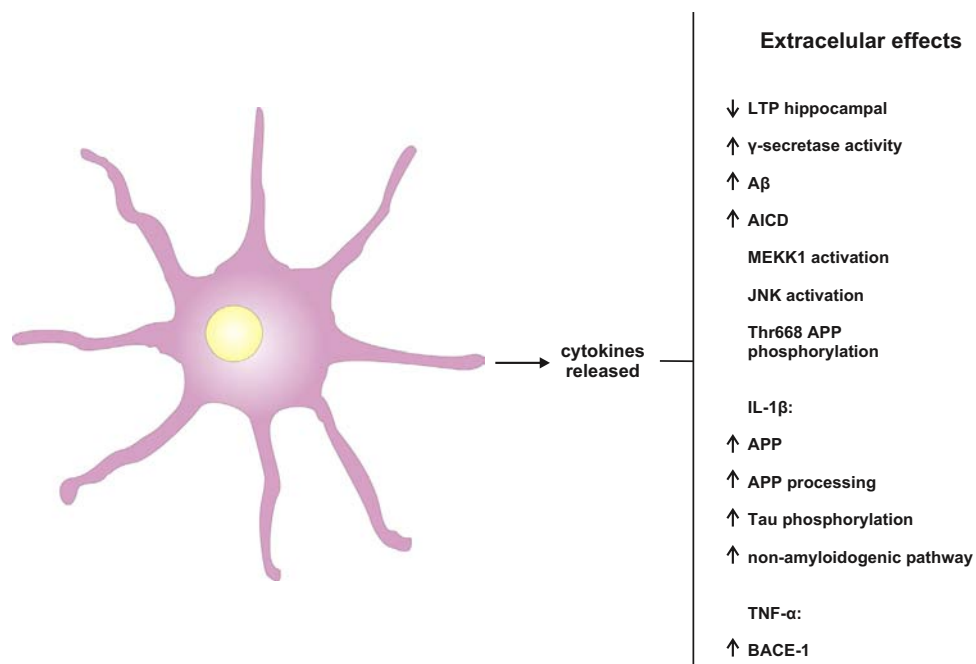


Fig. 3. Extracellular effects of the cytokines released by activated astrocytes. Following activation by harmful stimuli, astrocytes release a variety of cytokines that can activate signaling pathways, induce the expression of amyloidogenic proteins and affect memory formation and consolidation. LTP, long-term potentiation; MEKK1, MEK kinase 1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; BACE-1, β-site APP cleaving enzyme-1; APP, amyloid precursor protein; AICD, APP intracellular domain; Aβ, amyloid beta peptide; IL-1β, interleukin 1-β; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

fragment sAPP β (Hong et al., 2003). In astrocytoma-derived U373MG cells, the induction of BACE-1 expression by IFN- γ depends on the JAK2 and ERK1/2 signaling pathways, which in turn induce the phosphorylation of STAT1, which then binds to a sequence in the promoter region of BACE-1 to modulate its expression (Cho et al., 2007). In contrast, other studies have reported that BACE-1 mRNA levels do not change in astrocytes from Tg2576 mouse brains (Bigl et al., 2000) and that the β -secretase activity of primary astrocytes is controlled by BACE-2 protein because there is a translational block that prevents BACE-1 expression. It has also been suggested that, in astrocytoma cultures, treatment with cytokines, such as IFN- γ , IL- β and TNF- α , does not promote the expression of the BACE-1 enzyme and that inflammation may negatively and positively affect the modulation of β -secretase activity by BACE-2 depending on the differential responses of different brain regions (Bettegazzi et al., 2011). The differences in the effects found by various groups regarding the role of astrocytes in APP metabolism may depend on the different sources of the astrocytes or the differences in the durations of the exposure to the harmful stimuli; these differences also suggest the need for extensive investigations into the potential roles of astrocytes in A β generation and the relevant mechanisms involved. However, the cumulative evidence indicates that A β may activate astrocytes and lead to increases in the levels of the cytokine TNF- α , which has been suggested to be a causative factor in the cognitive dysfunction in AD; if this suggestion is accurate, a vicious cycle may be created (Akiyama et al., 2000; McCoy and Tansey, 2008; Perry et al., 2001; Santello et al., 2011). For example, the deletion of the TNF- α receptor 1 (TNFR1) gene in APP transgenic mice diminishes amyloid plaque formation and improves the cognitive deficits by down-regulating BACE-1 promoter activity (He et al., 2007), and the inhibition of TNF- α signaling reduces the accumulation of the intraneuronal amyloidogenic fragment β -CTF in the brains of 3xTg-AD mice treated with lipopolysaccharide (LPS) (McAlpine et al., 2009). Moreover, it has been reported that IL-1 β increases APP expression and exacerbates tau phosphorylation through the p38 MAPK signaling pathway (Kitazawa et al., 2011; Sheng et al., 2000; Yang et al., 1998). However, other studies have indicated that IL-1 β may play a beneficial role in limiting AD pathology by modulating innate immune responses or promoting non-amyloidogenic APP cleavage (Shaftel et al., 2007; Tachida et al., 2008). Additionally, marked increases in A β 40 and A β 42 have been observed in primary astrocytes and astrocytoma cells following stimulation with combinations of interferon- γ (IFN- γ) and TNF- α or IFN- γ and IL-1 β (Liao et al., 2004).

Another enzyme that may be involved in the amyloidogenic pathways is nicastrin, which acts as a key regulator of the presenilin 1 (PS1)-mediated cleavage of APP by γ -secretase. It has been reported that nicastrin mRNA is constitutively expressed in astrocytoma cells and is not regulated by cytokines such as TNF- α and IL-1 β (Sato and Kuroda, 2001). However, increases in PS1 and nicastrin expression have also been reported in activated astrocytes and microglia after traumatic brain injury, while in non-damaged brains, nicastrin and PS1 expression have been found to be restricted to neurons (Nadler et al., 2008). The endogenous mechanism regulating γ -secretase activity remains elusive. It has been shown that, in response to fibrillar A β , glial cells produce and release pro-inflammatory molecules that may attenuate microglial phagocytosis and enhance the formation of plaques in the brain (Koenigsknecht-Talbot and Landreth, 2005) and that the injection of A β 42 oligomers into the retrosplenial cortex results in marked activation of astrocytes together with an activation of the transcriptional nuclear factor- κ B (NF- κ B) and up-regulation of TNF- α , IL-1 β and COX-2 (Carrero et al., 2012). Elevated expressions of COX-2 mRNA and protein have been found predominantly in cortical and hippocampal neurons in AD brains (Ho et al., 2001;

Pasinetti and Aisen, 1998); conversely, COX-2 expression has been shown to decline in the advanced stages of the disease (Yermakova and O'Banion, 2001). COX-2 expression has also been detected in cultured astrocytes following A β treatment but not in the AD brain (Hoozemans et al., 2001). However, Carrero et al. showed that astrocytes express COX-2 in response to A β exposure in vivo (Carrero et al., 2012). Indeed, similar increases in astrocytic COX-2 expression have been demonstrated following pharmacological treatment with LPS in rodent brains, scrapie-infected mice and human brains after global ischemia (Font-Nieves et al., 2012; Hirst et al., 1999; Kim et al., 2007). Altogether, these studies suggest that, in the early stages of AD, astrocytes may initially express COX-2 in response to A β accumulation, but this process declines with the progression of the disease.

Taken together, the above findings strongly suggest that activated astrocytes produce and release proinflammatory molecules and cytokines that may be critical for the generation of A β because they activate β - and γ -secretases to generate a vicious autocrine feedback loop. Thus, intrinsic inflammatory mechanisms may represent a regulatory system that is capable of influencing the homeostasis of APP processing and A β production in the AD brain.

An important issue that needs to be addressed regarding the mechanisms of AD progression is the temporal relationships between A β accumulation and glial activation. Studies in human brains have found a linear increase in astrocytosis and microgliosis together with disease evolution. This analysis has revealed that the progression of activated astroglia is different from that of amyloid deposits, suggesting that gliosis could contribute to the ongoing neurodegeneration (Serrano-Pozo et al., 2011). Similarly, using a multitracer PET investigation in patients with mild cognitive impairment and mild AD, astrocytosis was determined to be an early phenomenon in AD development (Carter et al., 2012).

7. Other relevant biochemical pathways implicated in AD triggered by astrocytes

7.1. Calcium signaling

Astrocytes may communicate among themselves and with neurons through regulated increases in intracellular calcium concentrations $[Ca^{2+}]_i$ (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990; Nedergaard et al., 2003; Seifert et al., 2006). Calcium signaling in astrocytes plays critical roles in the bidirectional communication between neurons and astrocytes (Fellin, 2009; Pasti et al., 1997; Scemes and Giaume, 2006) and potentially modulates neuronal activity and survival (Parri et al., 2001; Takano et al., 2006). Changes in intracellular calcium levels have also been implicated in the regulation of gene expression in both neurons and astrocytes (Dolmetsch et al., 1998; Morita et al., 2003). The accumulation of A β fragments and the sustained disruption of intraneuronal $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis are components of an early prevailing hypotheses for the pathogenesis of AD (Hardy and Selkoe, 2002; Stutzmann et al., 2004; Thibault et al., 2007). Hence, it is possible that the changes in astrocytic Ca^{2+} dynamics induced by A β may also contribute to cell dysfunction in AD (Haughey and Mattson, 2003; Mattson and Chan, 2003). For example, it is known that the intracellular Ca^{2+} transients exhibited by astrocytes exposed to A β result in Ca^{2+} -dependent glutathione depletion in neurons and the consequent formation of reactive oxygen species (ROS) by the astrocytes that are directly involved in neuronal death (Abramov et al., 2003, 2004). Following this line of evidence, Chow et al. (2010) showed that relatively low concentrations of A β induce intracellular calcium transients and spontaneous intercellular Ca^{2+} waves in cultured astrocytes. These authors also demonstrated that A β -induced Ca^{2+} changes upregulate GFAP and S100 β . These results suggest that A β may

potentially affect the physiopathology of astrocytes in AD. Moreover, at nontoxic concentrations, the monomeric form of A β 42 activates signaling pathways that lead to the transcriptional activation of β -secretase (Piccini et al., 2012). BACE-1 expression is dependent on a calcineurin (CaN) signaling cascade that is activated by Ca $^{2+}$ entry through Ca $^{2+}$ permeable channels that are formed by membrane-inserted A β in astrocytes (Jin et al., 2012). A recently developed cell-permeable peptide, Tat-Pro, disrupts the complex between synapse-associated protein 97 (SAP97) and the α -secretase to promote alterations of the trafficking of the enzyme, which is important for the non-amyloidogenic processing of APP. Both Tat-Pro treatment and treatment with exogenous A β deregulate Ca $^{2+}$ homeostasis in astrocytes by increasing metabotropic glutamate receptor-5 (mGluR5) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 (IP $_3$ R1) levels. The inhibition of CaN reverses these effects, and treatment with Tat-Pro significantly increases the amount of A β 42 in the medium of cultured astrocytes. Another study showed that A β 42 leads to cytosolic Ca $^{2+}$ increases, which in turn lead to CaN activation, which activates the NF- κ B-dependent transcription of mGluR5. Interestingly, in the brains of AD patients, mGluR5 immunostaining is augmented in the hippocampal astrocytes that are in close proximity to the A β plaques and co-localizes with the nuclear accumulation of the p65 NF- κ B subunit and with increases in CaN α staining (Lim et al., 2013). Astrocytes exposed to A β 42 exhibit spontaneous cytosolic Ca $^{2+}$ transients with increased frequencies and amplitudes. It has been suggested that these effects also depend on the activation of the α 7 nicotinic acetylcholine receptors (α 7-nAChRs) (Lee et al., 2013). Taken together, these results support the notion that astrocytes may be active players in the production of A β and indicate that glial cells may also be important mediators in the Ca $^{2+}$ hypothesis of AD (Grolla et al., 2013)

7.2. Excitotoxicity

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the CNS and is known to be involved in a variety of functions, including synaptic transmission, synaptic plasticity, neuronal growth and differentiation, and learning and memory (Butterfield and Pocernich, 2003; Francis, 2003). Moreover, glutamate excitotoxicity is an important mechanism of neuronal death in ischemia, hypoglycemia, and trauma (Choi, 1988). Several studies reinforce the essential role of astrocyte glutamate transporters in maintaining extracellular glutamate concentrations below toxic levels. For example, in astrocyte-free cortical cultures, the neuronal vulnerability to glutamate is 100-fold greater than in astrocyte-containing cultures (Rosenberg and Aizenman, 1989). Diminished glutamate uptakes by cultured astrocytes derived from AD patients and from transgenic mouse models of AD have also been reported (Beart and O'Shea, 2007; Hardy et al., 1987; Liang et al., 2002). Reduced glutamate uptake in autopsy tissue is known to correlate with indexes of cell death and the ablation of the synaptic marker synaptophysin. The astrocyte-specific glutamate transporter GLT-1/EAAT2 undergoes oxidative modification (Lauderback et al., 2001) and exhibits reduced activity in AD (Masliah et al., 1996). This reduction may have several pathological implications for brain function because the majority of glutamate uptake from the synaptic cleft is mediated by GLT-1/EAAT2 (Melone et al., 2009). In homogenates of AD cortex, GFAP and EAAT2 expression are inversely correlated, and there are trends toward increased expression of GFAP and decreased expression of EAAT2 that correspond with the advanced Braak and Braak stages (Simpson et al., 2010). Similarly, another astrocytic glutamate transporter, GLAST/EAAT1, is aberrantly expressed in a subset of cortical pyramidal neurons (Scott et al., 2002). Collectively, these observations suggest that AD involves a profound impairment in the capacity of astrocytes

to eliminate glutamate from the extracellular space that may predispose neurons to excitotoxicity. The aberrant expression of astrocytic-dependent glutamate transporters might be a compensatory response.

It has been demonstrated that reduced levels of EAAT2 and inversely correlated with APP mRNA levels, which may indicate that the abnormal function and/or processing of APP is associated with alterations in the regulation of EAAT2 levels and functions (Li et al., 1997). Moreover, the expression of mutant forms of APP disturbs the astroglial transport of excitatory amino acids at the post-transcriptional level and increases susceptibility to glutamate toxicity (Masliah et al., 2000).

In 2011, Scott et al. (2011) found specific variations in EAAT2 splice variant expression in an AD brain obtained by autopsy. While wild-type EAAT2 exhibits a global reduction in expression, brain regions that are susceptible to neuronal loss exhibit greater expression of transcripts that reduce glutamate transport in an *in vitro* assay. However, other splice variants of EAAT2, such as EAAT2b, exhibit no significant variation with disease state (Scott et al., 2011). Recently, Scimemi et al. (2013) found that A β 42 markedly prolongs the extracellular lifetime of the glutamate released into the synaptic space by reducing GLT-1/EAAT2 membrane expression in mouse astrocytes and that this effect is prevented by the antioxidant trolox. However, another study showed that A β enhances the L-glutamate clearance capacity of astrocytes by increasing the expression of the glutamate transporter GLAST/EAAT1. This effect of A β is not affected by antioxidants (Abe and Misawa, 2003).

Several lines of evidence have suggested that cytokines are a primary cause of the changes in the glutamate-glutamine cycle in AD. When astrocytes are exposed to TNF- α , the expression of GLAST/EAAT1 is downregulated (Korn et al., 2005), and the expression of glutamine synthetase (GS) is reduced to 30% of basal levels (Zou et al., 2010). These reductions are accompanied by a significant decrease in glutamate uptake and by subsequent reductions in glutamine release. Furthermore, when co-cultures of astrocytes and neurons are treated with TNF- α , the astrocytes lose their capacity to protect neurons from glutamate excitotoxicity (Zou et al., 2010).

7.3. Acetylcholine dysfunction

One of the prevalent neurochemical hypotheses about the cognitive deficits of AD is the cholinergic deficit hypothesis that was proposed by Davies and Maloney (1976). The neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are members of the super-family of ligand-gated ion channels and are involved in a number of important physiological functions of the brain, including cognitive functions such as learning and memory (Paterson and Nordberg, 2000). Despite the loss of central cholinergic neurons, more recent research has revealed consistent deficiencies in the α 4 nAChR in several brain regions in patients with sporadic AD and in members of familial APP Swedish mutation (APPswe FAD) (Guan et al., 2000; Martin-Ruiz et al., 1999; Nordberg, 2001; Wevers et al., 1999; Yu et al., 2003). Interestingly, a selective increase in the proportion of astrocytes expressing α 7 nAChR, which alters Ca $^{2+}$ homeostasis and NO production, has been observed in sporadic AD and in familial APPswe AD brains, which suggests that an important link between this receptor and the enhanced alterations of APP metabolism and brain inflammation exists (Teaktong et al., 2003; Yu et al., 2005). Astrocytes exposed to cholesterol exhibit decreases in the expression of α 7 nAChR, whereas lovastatin, which inhibits of cholesterol synthesis, promotes an upregulation of this receptor. Moreover, lovastatin mediates an increase in sAPP α that can be partially inhibited by the α 7 nAChR antagonists α -bungarotoxin and methyl lycaconitine.

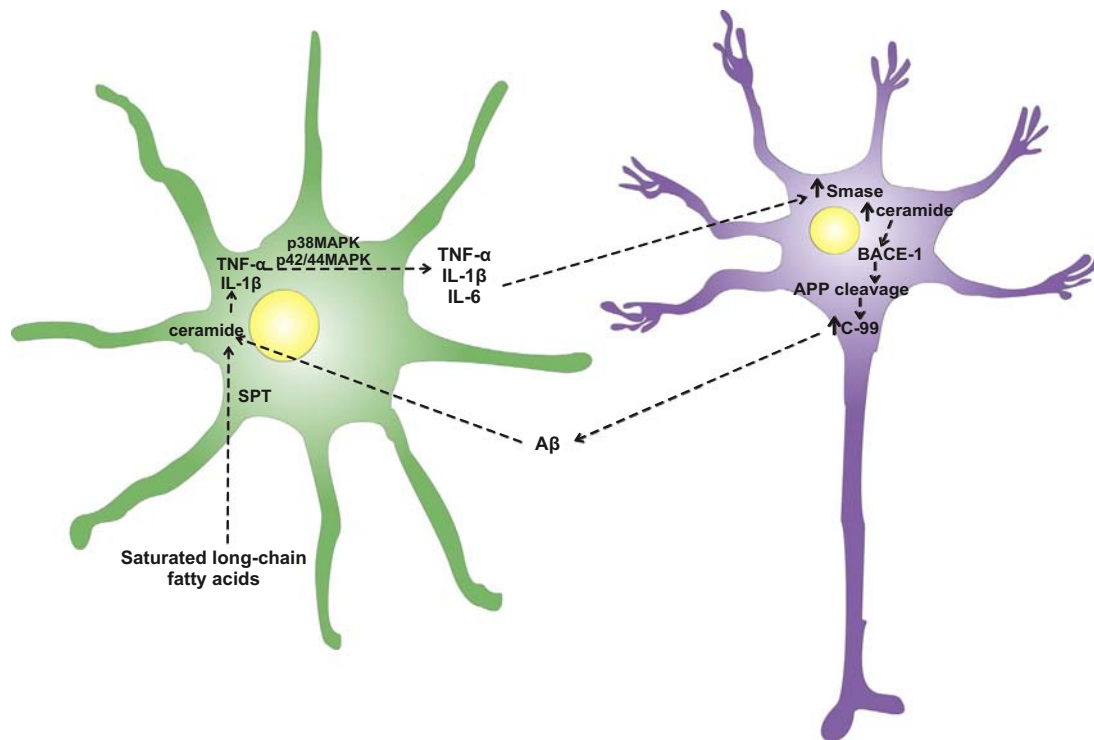


Fig. 4. Effect of palmitic acid on astrocyte activation and A β production.

As proposed by Patil et al. (2006, 2007, 2008), Gupta et al. (2012) and Liu et al. (2013) saturated free fatty acids, such as palmitic acid, are converted into ceramide by a serine palmitoyltransferase in astrocytes. The increase in ceramide levels enhances the release of TNF- α , IL-1 β and IL-6 through the p38 or p42/44 MAPK pathways. The released cytokines activate acidic SMase in neurons and increase ceramide levels and BACE-1 activity to promote C-99 and A β formation. A β can also affect ceramide levels. PA, palmitic acid; SPT, serine palmitoyltransferase; IL-1 β , interleukin 1- β ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL-6, interleukin-6; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; p42/44 MAPK, p24/44 mitogen-activated protein kinase or ERK1/2; SMase, acidic sphingomyelinase; BACE-1, β -site APP cleaving enzyme-1; C-99, C-terminal fragment of APP derived from BACE-1 cleavage; A β , amyloid β peptide.

7.4. Fatty acids and astrocytic activation

Epidemiological studies suggest that a high-fat diet is a significant risk factor for the development of AD and that the degree of saturation of the fatty acids is critical in determining this risk (Grant, 1999; Scarmeas et al., 2006; Solfrizzi et al., 2005). Although the physiopathological mechanism responsible for this metabolic connection is not clearly understood, the ability of long-chain saturated fatty acids to activate inflammatory responses in the body is well recognized (Kennedy et al., 2009). The effects of serum free fatty acids on brain inflammation have not been directly evaluated, but there is evidence that increased levels of saturated fatty acids can alter CNS function. Fatty acids cross the BBB (Dhopeswarkar and Mead, 1973; Gupta et al., 2012; Smith and Nagura, 2001), and high-fat diets might increase the uptake of fatty acids into the brain from the plasma (Karmi et al., 2010; Wang et al., 1994). Cultured astrocytes take up exogenously added fatty acids (Bernoud et al., 1998; Morand et al., 1979), which suggest that astrocytes located near the BBB may take up and accumulate the excess fatty acids that are derived from the diet and deliver these fatty acids to neurons. Saturated free fatty acids, such as palmitic acid (PA) and lauric acid (LA), trigger some inflammatory markers in cultured macrophages (Laine et al., 2007) and modulate amyloid processing in neurons and astrocytes (Patil et al., 2006; Patil and Chan, 2005). Indeed, when cortical neurons are exposed to conditioned medium isolated from PA-treated astrocytes, the expression of BACE-1 is increased and, consequently, the levels of the C-terminal fragment of APP (C99) are elevated (Fig. 4). This increase in the amyloidogenic process of APP is prevented by antioxidants (Patil et al., 2006), and in vivo studies have produced similar results. Cortical neurons that are exposed to conditioned media derived from palmitate-treated

astrocytes of two different rat brain regions (the cortex and cerebellum) exhibit differential changes in BACE-1 and phospho-tau levels. While conditioned media from cortical palmitate-treated astrocytes significantly elevates phospho-tau and BACE-1 in cortical neurons, the media produced by cerebellar astrocytes does not (Patil et al., 2008). In addition to the observed involvement of PA in inducing the AD-like markers described above, PA treatment also decreases basal glucose uptake and downregulates the astroglial glucose transporter GLUT-1 (Patil et al., 2007). These results are relevant in that glucose metabolism is severely compromised in AD. One mechanism that has been proposed to be involved in the astrocyte-dependent neuronal changes that occur in response to PA exposure is thought to be mediated by the enzyme serine palmitoyltransferase (SPT), which increases ceramide levels in astrocytes and thus enhances TNF- α and IL-1 β release. Hence, cytokines activate the sphingomyelinase enzyme (SMase) in neurons, which participates in the PA-induced upregulation of BACE-1. The levels of both ceramides and the enzyme SPT are significantly upregulated in AD brains compared to those of healthy controls (Han et al., 2002; Liu et al., 2013). Accordingly, the inhibition of SPT in astrocytes decreases the levels of both TNF- α and IL-1 β in the media, which in turn reduces the SMase activities and BACE-1 levels in primary neurons (Liu et al., 2013). This PA-induced cytokine release does not involve the activation of microglia because the depletion of microglia from primary astrocyte cultures does not modify the degree of cytokine release. Studies using inhibitors of the p38 and p42/44 MAPK pathways have indicated that this signaling route is involved in the pro-inflammatory effects of PA. Interestingly, the long-chain polyunsaturated fatty acid ω -3 docosahexaenoic acid (DHA) prevents the proinflammatory actions of PA in astrocytes. Collectively, these data establish the ability of saturated fatty acids

to induce astrocyte inflammation *in vitro* and thus to modulate elements of the amyloidogenic pathway (Gupta et al., 2012).

8. Conclusion

Although the prevailing view is that astrocytes respond secondarily to neuronal damage, we have shown that there is abundant and growing evidence supporting the role of these cells as active participants in many of the mechanisms that are associated with the pathophysiology of AD. Interactions between dysfunctional astrocytes and neighboring neurons can initiate a cascade of events that culminates in neuronal injury and the expression of the hallmark lesions of AD. Astrocyte damage may also affect the proper functioning of neuronal circuits due to the role of astrocytes in maintaining synaptic homeostasis. Thus, the reactive changes that occur in astrocytes presumably compete with the normal functions of astrocytes that support neuronal health and the integrity of the BBB, and this competition promotes a harmful microenvironment and perpetuates a vicious cycle of inflammatory changes. Although the majority of studies come from *in vitro* and transgenic animal models, valuable information must be obtained from the analysis of human post-mortem samples or using dynamic imaging approaches. Future efforts will need to account for the molecular and functional diversity that is involved in the astrocyte dysfunction that is associated with the development and progression of AD. This topic may have profound implications for our understanding of the pathogenesis of neurodegenerative diseases, and the restoration of astrocytic function may be a potential target of the treatment of AD.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACYT 166482 and PAPIIT IN204212. E. Avila-Muñoz is supported by CONACYT 239696.

References

- Abe, K., Misawa, M., 2003. Amyloid beta protein enhances the clearance of extracellular L-glutamate by cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci. Res.* 45, 25–31.
- Abramov, A.Y., Canevari, L., Duchen, M.R., 2003. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J. Neurosci.* 23, 5088–5095.
- Abramov, A.Y., Canevari, L., Duchen, M.R., 2004. Calcium signals induced by amyloid β peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1742, 81–87.
- Agdeppa, E.D., Kepe, V., Petri, A., Satyamurthy, N., Liu, J., Huang, S.C., Small, G.W., Cole, G.M., Barrio, J.R., 2003. *In vitro* detection of (S)-naproxen and ibuprofen binding to plaques in the Alzheimer's brain using the positron emission tomography molecular imaging probe 2-(1-[6-[(2-[(18F)fluoroethyl](methyl)amino]-2-naphthyl]ethylidene)malono nitrile. *Neuroscience* 117, 723–730.
- Agulhon, C., Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2010. Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca^{2+} signaling. *Science* 327, 1250–1254.
- Agulhon, C., Petravic, J., McMullen, A.B., Sweger, E.J., Minton, S.K., Taves, S.R., Casper, K.B., Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59, 932–946.
- Agulhon, C., Sun, M.Y., Murphy, T., Myers, T., Lauderdale, K., Fiacco, T.A., 2012. Calcium signaling and gliotransmission in normal vs reactive astrocytes. *Front. Pharmacol.* 3, 139.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikeleboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W.S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegryzniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T., 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 383–421.
- Apelt, J., Ach, K., Schliebs, R., 2003. Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. *Neurosci. Lett.* 339, 183–186.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Araujo, D.M., Lapchak, P.A., 1994. Induction of immune system mediators in the hippocampal formation in Alzheimers and Parkinsons diseases—selective effects on specific interleukins and interleukin receptors. *Neuroscience* 61, 745–754.
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., Newman, E.A., 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232–243.
- Basak, J.M., Vergheze, P.B., Yoon, H., Kim, J., Holtzman, D.M., 2012. Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of $\text{A}\beta$ uptake and degradation by astrocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 13959–13971.
- Beart, P.M., O'Shea, R.D., 2007. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br. J. Pharmacol.* 150, 5–17.
- Bernoud, N., Fenart, L., Bénistant, C., Pageaux, J.F., Dehouck, M.P., Molière, P., Lagarde, M., Cecchelli, R., Lecerf, J., 1998. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in bloodbrain barrier endothelial cells *in vitro*. *J. Lipid Res.* 39, 1816–1824.
- Bettegazzi, B., Mihailovich, M., Di Cesare, A., Consonni, A., Macco, R., Pelizzoni, I., Codazzi, F., Grohovaz, F., Zacchetti, D., 2011. β -Secretase activity in rat astrocytes: translational block of BACE1 and modulation of BACE2 expression. *Eur. J. Neurosci.* 33, 236–243.
- Bigl, M., Apelt, J., Lushechikina, E.A., Lange-Dohna, C., Roßner, S.S., 2000. Expression of beta-secretase mRNA in transgenic Tg2576 mouse brain with Alzheimer plaque pathology. *Neurosci. Lett.* 292, 107–110.
- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P.N., Shaw, P.J., 2009. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 57, 1251–1264.
- Blasko, I., Veerhuis, R., Stampfer-Kountchev, M., Saurwein-Teissl, M., Eikelenboom, P., Grubeck-Loebenstein, B., 2000. Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 7, 682–689.
- Butterfield, D.A., Pocernich, C.B., 2003. The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 17, 641–652.
- Buxbaum, J.D., Oishi, M., Chen, H.L., Pinkas-Kramarski, R., Jaffe, E.A., Gandy, S.E., Greengard, P., 1992. Cholinergic agonists, and interleukin 1 regulate processing, and secretion of the Alzheimer β /A4 amyloid protein precursor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10075–10078.
- Carpentier, M., Robitaille, Y., DesGroseillers, L., Boileau, G., Marcinkiewicz, M., 2002. Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 849–856.
- Carrero, I., Gonzalo, M.R., Martin, B., Sanz-Anquela, J.M., Arevalo-Serrano, J., Gonzalo-Ruiz, A., 2012. Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp. Neurol.* 236, 215–227.
- Carter, S.F., Schöll, M., Almkvist, O., Wall, A., Engler, H., Långström, B., Nordberg, A., 2012. Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracier PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *J. Nucl. Med.* 53, 37–46.
- Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R., Sanderson, M.J., 1991. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6, 983–992.
- Cho, H.J., Kim, S.-K., Jin, S.M., Hwang, E.-M., Kim, Y.S., Huh, K., Mook-Jung, I., 2007. IFN- γ -induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes. *Glia* 55, 253–262.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623–634.
- Chow, S.-K., Yu, D., MacDonald, C.L., Buibas, M., Silva, G.A., 2010. Amyloid β -peptide directly induces spontaneous calcium transients, delayed intercellular calcium waves and gliosis in rat cortical astrocytes. *ASN Neuro* 2 (art:e00026). doi: 10.1042/AN20090035.
- Cordonnier, C., van der Flier, W.M., 2011. Brain microbleeds and Alzheimer's disease: innocent observation or key player? *Brain* 134, 335–344.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., Smith, S.J., 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signaling. *Science* 247, 470–473.
- Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine Jr., W.B., Baker, L.K., Krafft, G.A., LaDu, M.J., 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.* 277, 32046–32051.
- Davies, P., Maloney, A.J., 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.
- de la Torre, C., 2004. Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol.* 3, 184–190.
- Dhopeswarkar, G.A., Mead, J.F., 1973. Uptake and transport of fatty acids into the brain and role of the bloodbrain barrier system. *Adv. Lipid Res.* 11, 109–142.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K., Lewis, R.S., 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392, 933–936.
- Dorfman, V.B., Pasquini, L., Riudavets, M., Lopez-Costa, J.J., Villegas, A., Troncoso, J.C., Lopera, F., Castano, E.M., Morelli, L., 2010. Differential cerebral deposition of IDE and NEP in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 31, 1743–1757.
- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138–145.
- Fellin, T., 2009. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J. Neurochem.* 108, 533–544.

- Fiacco, T.A., Aguilhon, C., Taves, S.R., Petravic, J., Casper, K.B., Dong, X., Chen, J., McCarthy, K.D., 2007. Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron* 54, 611–626.
- Font-Nieves, M., Sans-Fons, M.G., Gorina, R., Bonfill-Teixidor, E., Salas-Perdomo, A., Marquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., Planas, A.M., 2012. Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 6454–6468.
- Francis, P.T., 2003. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18, 15–21.
- Gordon, G.R., Mulligan, S.J., MacVicar, B.A., 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55, 1214–1221.
- Grant, W.B., 1999. Dietary links to Alzheimer's disease: 1999 update. *J. Alzheimers Dis.* 1, 197–201.
- Grolla, A.A., Fakhfouri, G., Balzaretto, G., Marcello, E., Gardoni, F., Canonico, P.L., DiLuca, M., 2013. A β leads to Ca²⁺ signaling alterations and transcriptional changes in glial cells. *Neurobiol. Aging* 34, 511–522.
- Guan, Z.Z., Zhang, X., Ravid, R., Nordberg, A., 2000. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 74, 237–243.
- Guénette, S.Y., 2003. Astrocytes: a cellular player in A β clearance and degradation. *Trends Mol. Med.* 9, 279–280.
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., Bruce-Keller, A.J., 2012. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J. Neurochem.* 120, 1060–1071.
- Guo, L., Sawkar, A., Zasadzki, M., Watterson, D.M., Van Eldik, L.J., 2011. Similar activation of glial cultures from different rat brain regions by neuroinflammatory stimuli and downregulation of the activation by a new class of small molecule ligands. *Neurobiol. Aging* 22, 975–981.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G., 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 13, 54–63.
- Halassa, M.M., Haydon, P.G., 2010. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 335–355.
- Han, X.M., Holtzman, D., McKeel Jr., D.W., Kelley, J., Morris, J.C., 2002. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J. Neurochem.* 82, 809–818.
- Hartlage-Rubsamen, M., Zeitschel, U., Apelt, J., Gartner, U., Franke, H., Stahl, T., Gunther, A., Schliebs, R., Penkova, M., Bigl, V., RoBner, S., 2003. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease β -secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia* 41, 169–179.
- Hardy, J.A., Cowburn, R.F., Barton, A.J.L., Reynolds, G.P., Lofdahl, E., O'Carroll, A.-M., Wester, P., Winblad, B., 1987. Region-specific loss of glutamate innervation in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 73, 77–80.
- Hardy, J., 1997. The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2095–2097.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Haughey, N.J., Mattson, M.P., 2003. Alzheimer's amyloid beta-peptide enhances ATP/gap junction-mediated calcium-wave propagation in astrocytes. *Neuro-molecular. Med.* 3, 173–180.
- He, P., Zhong, Z., Lindholm, K., Berning, L., Lee, W., Lemere, C., Staufenbiel, M., Li, R., Shen, Y., 2007. Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J. Cell Biol.* 178, 829–841.
- Henka, M.T., O'Banion, M.K., 2010. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 117, 919–947.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H., Rusakov, D.A., 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463, 232–236.
- Hirst, W.D., Young, K.A., Newton, R., Allport, V.C., Marriott, D.R., Wilkin, G.P., 1999. Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell Neurosci.* 13, 57–68.
- Ho, L., Purohit, D., Haroutunian, V., Luteran, J.D., Willis, F., Naslund, J., Buxbaum, J.D., Mohs, R.C., Aisen, P.S., Pasinetti, G.M., 2001. Neuronal cyclooxygenase 2 expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 58, 487–492.
- Hong, H.S., Hwang, E.M., Sim, H.J., Cho, J.-H., Boo, J.H., Oh, S.S., 2003. Interferon γ stimulates β -secretase expression and sAPP β production in astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 922–927.
- Hoozemans, J.J., Rozemuller, A.J., Janssen, I., De Groot, C.J., Veerhuis, R., Eikelenboom, P., 2001. Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol.* 101, 2–8.
- Hou, L., Liu, Y., Wang, X., Ma, H., He, J., Zhang, Y., Yu, C., Guan, W., Ma, Y., 2011. The effects of amyloid- β 42 oligomer on the proliferation and activation of astrocytes in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 47, 573–580.
- Iadecola, C., Nedergaard, M., 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10, 1369–1376.
- Imbimbo, B.P., Solfrizzi, V., Panza, F., 2010. Are NSAIDs useful to treat Alzheimer's disease or mild cognitive impairment? *Front. Aging Neurosci.* 2, 1–20.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T.C., 2000. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* 6, 143–150.
- Jarvis, K., Assis-Nascimento, P., Mudd, L.M., Montague, J.R., 2007. Amyloid toxicity and reversal in embryonic rat septal neurons. *Neurosci. Lett.* 423, 184–188.
- Jellinger, K.A., 2002. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J. Neural. Transm.* 109, 813–836.
- Jin, S.M., Cho, H.J., Kim, Y.W., Hwang, J.Y., Mook-Jung, I., 2012. A β -induced Ca(2+) influx regulates astrocytic BACE1 expression via calcineurin/NFAT4 signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 649–655.
- Kalaria, R.N., 2000. The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 321–330.
- Kalaria, R.N., 1999. The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 893, 113–125.
- Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J.A., Jansen, A.H., Verweir, M., de Groot, L.R., Smith, V.D., Rangarajan, S., Rodríguez, J.J., Orre, M., Hol, E.M., 2012. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One* 7, e42823.
- Karmi, A., Iozzo, P., Viljanen, A., Fielding, B.A., Virtanen, K., Oikonen, V., Kempainen, J., Viljanen, T., Guiducci, L., Haaparanta-Solin, M., Nägren, K., Solin, O., Nuutila, P., 2010. Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes* 59, 2171–2177.
- Kato, S., Gondo, T., Hoshii, Y., Takahashi, M., Yamada, M., Ishihara, T., 1998. Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. *Pathol. Int.* 48, 332–340.
- Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.C., LaPoint, K., McIntosh, M., 2009. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J. Nutr.* 139, 1–4.
- Kim, J., Castellano, J.M., Jiang, H., Basak, J.M., Parsadanian, M., Pham, V., Mason, S.M., Paul, S.M., Holtzman, D.M., 2009. Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A β clearance. *Neuron* 64, 632–644.
- Kim, J.L., Jin, J.K., Choi, E.K., Spinner, D., Rubenstein, R., Carp, R.I., Kim, Y.S., 2007. Increased expression and localization of cyclooxygenase-2 in astrocytes of scrapie-infected mice. *J. Neuroimmunol.* 187, 74–82.
- Kitazawa, M., Cheng, D., Tsukamoto, M.R., Koike, M.A., Wes, P.D., Vasilevko, V., Cribbs, D.H., LaFerla, F.M., 2011. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal β -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J. Immunol.* 187, 6539–6549.
- Koehler, R.C., Roman, R.J., Harder, D.R., 2009. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci.* 32, 160–169.
- Koenigsnecht-Talbot, J., Landreth, G.E., 2005. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J. Neurosci.* 25, 8240–8249.
- Korn, T., Magnus, T., Jung, S., 2005. Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor- α . *FASEB J.* 19, 1878–1880.
- Kraft, A.W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., Gil, S.C., Brown, J., Wilhelmsson, U., Restivo, J.L., Cirrito, J.R., Holtzman, D.M., Kim, J., Pekny, M., Lee, J.M., 2013. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J.* 27, 187–198.
- Laine, P.S., Schwartz, E.A., Wang, Y., Zhang, W.Y., Karnik, S.K., Musi, N., Reaven, P.D., 2007. Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 150–155.
- Lanzrein, A.S., Johnston, C.M., Perry, V.H., Jobst, K.A., King, E.M., Smith, A.D., 1998. Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor- α , the soluble tumor necrosis factor receptors I and III, and alpha(1)-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 12, 215–227.
- Lauderback, C.M., Hackett, J.M., Huang, F.F., Keller, J.N., Szweda, L.I., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A., 2001. The glial glutamate transporter GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *J. Neurochem.* 78, 413–416.
- Lee, L., Kosuri, P., Arancio, O., 2013. Picomolar amyloid- β peptides enhance spontaneous astrocyte calcium transients. *J. Alzheimers Dis.* [Epub ahead of print].
- Leuba, G., Wernli, G., Vernay, A., Kraftsik, R., Mohajeri, M.H., Saini, K.D., 2005. Neuronal and nonneuronal quantitative BACE immunocytochemical expression in the entorhinohippocampal and frontal regions in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cognit. Disord.* 19, 171–183.
- Leung, R., Proitsi, P., Simmons, A., Lunnon, K., Güntert, A., Kronenberg, D., Pritchard, M., Tsolaki, M., Mecocci, P., Kloszewska, I., Vellas, B., Soininen, H., Wahlund, L.O., Lovestone, S., 2013. Inflammatory proteins in plasma are associated with severity of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8, e64971.
- Li, S., Mallory, M., Alford, M., Tanaka, S., Masliah, E., 1997. Glutamate transporter alterations in Alzheimer's disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 901–911.
- Liang, Z., Valla, J., Sefidvash-Hockley, S., Rogers, J., Li, R., 2002. Effects of estrogen treatment on glutamate uptake in cultured human astrocytes derived from cortex of Alzheimer's disease patients. *J. Neurochem.* 80, 807–814.
- Liao, Y.-F., Wang, B.-J., Cheng, H.-T., Kuo, L.-H., Wolfe, M.S., 2004. Tumor necrosis factor- α , interleukin- β , and interferon- γ stimulate γ -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 49523–49532.
- Licastro, F., Mallory, M., Hansen, L.A., Masliah, E., 1998. Increased levels of alpha-1-antichymotrypsin in brains of patients with Alzheimer's disease correlate with activated astrocytes and are affected by APOE 4 genotype. *J. Neuroimmunol.* 88, 105–110.

- Lichtenthaler, S.F., Haass, C., Steiner, H., 2011. Regulated intramembrane proteolysis—lessons from amyloid precursor protein processing. *J. Neurochem.* 117, 779–796.
- Lim, D., Iyer, A., Ronco, V., Grolla, A.A., Canonico, P.L., Aronica, E., Genazzani, A.A., 2013. Amyloid beta deregulates astroglial mGluR5-mediated calcium signaling via calcineurin and NF- κ B. *Glia* 61, 1134–1145.
- Liu, L., Martin, R., Chan, C., 2013. Palmitate-activated astrocytes via serine palmitoyltransferase increase BACE1 in primary neurons by sphingomyelinases. *Neurobiol. Aging* 34, 540–550.
- Lleo, A., Berezovska, O., Herl, L., Raju, S., Deng, A., Bacskai, B.J., Frosch, M.P., Irizarry, M., Hyman, B.T., 2004. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation. *Nat. Med.* 10, 1065–1066.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2006. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 679–689.
- Martin-Ruiz, C.M., Court, J.A., Molnar, E., Lee, M., Gotti, C., Mamalaki, A., Tsoloufis, T., Tzartos, S., Ballard, C., Perry, R.H., Perry, E.K., 1999. Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 73, 1635–1640.
- Masliyah, E., Alford, M., DeTeresa, R., Mallory, M., Hansen, L., 1996. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 40, 759–766.
- Masliyah, E., Alford, M., Mallory, M., Rockenstein, E., Moechars, D., Van Leuven, F., 2000. Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Exp. Neurol.* 163, 381–387.
- Mattson, M.P., Chan, S.L., 2003. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* 34, 385–397.
- McAlpine, F.E., Lee, J.K., Harms, A.S., Ruhn, K.A., Blurton-Jones, M., Hong, J., Das, P., Golde, T.E., LaFerla, F.M., Oddo, S., Blesch, A., Tansey, M.G., 2009. Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol. Dis.* 34, 163–177.
- McCoy, M.K., Tansey, M.G., 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation* 5, 45.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 2003. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiophysarmacol. Biol. Psychiatry* 27, 741–749.
- Medeiros, R., LaFerla, F.M., 2013. Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp. Neurol.* 239, 133–138.
- Melone, M., Bellei, M., Conti, F., 2009. Synaptic localization of GLT-1a in the rat somatic sensory cortex. *Glia* 57, 108–117.
- Mohajeri, M., Wollmer, M.A., Nitsch, R.M., 2002. Ab42-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 35460–35465.
- Morand, O., Baumann, N., Bourre, J.M., 1979. In vivo incorporation of exogenous [14 C] stearic acid into neurons and astrocytes. *Neurosci. Lett.* 13, 177–181.
- Morimoto, K., Horio, J., Satoh, H., Sue, L., Beach, T., Arita, S., Tooyama, I., Konishi, Y., 2011. Expression profiles of cytokines in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients compared to the brains of non-demented patients with and without increasing ad pathology. *J. Alzheimers Dis.* 25, 59–76.
- Morita, M., Higuchi, C., Moto, T., Kozuka, N., Susuki, J., Itofusa, R., Yamashita, J., Kudo, Y., 2003. Dual regulation of calcium oscillation in astrocytes by growth factors and pro-inflammatory cytokines via the mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Neurosci.* 23, 10944–10952.
- Mrak, R.E., Griffin, W.S., 2001a. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 915–922.
- Mrak, R.E., Griffin, W.S.T., 2001b. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 903–908.
- Mulder, S.D., Veerhuis, R., Blankenstein, M.A., Nielsen, H.M., 2012. The effect of amyloid associated proteins on the expression of genes involved in amyloid- β clearance by adult human astrocytes. *Exp. Neurol.* 233, 373–379.
- Nadler, Y., Alexandrovich, A., Grigoriadis, N., Hartmann, T., Rao, K.S.J., Shohami, E., Stein, R., 2008. Increased expression of the γ -secretase components presenilin-1 and nicastrin in activated astrocytes and microglia following traumatic brain injury. *Glia* 56, 552–567.
- Nagele, R.G., D'Andrea, M.R., Lee, H., Venkataraman, V., Wang, H.Y., 2003. Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease. *Brain Res.* 971, 197–209.
- Nagele, R.G., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K.C., 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25, 663–674.
- Nedergaard, M., Ransom, B., Goldman, S.A., 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523–530.
- Nicoll, J.A., Weller, R.O., 2003. A new role for astrocytes: beta-amyloid homeostasis and degradation. *Trends Mol. Med.* 9, 281–282.
- Nielsen, H.M., Veerhuis, R., Holmqvist, B., Janciauskiene, S., 2009. Binding and uptake of Abeta1–42 by primary human astrocytes in vitro. *Glia* 57, 978–988.
- Nielsen, H.M., Mulder, S.D., Beliën, J.A., Musters, R.J., Eikelenboom, P., Veerhuis, R., 2010. Astrocytic Abeta1–42 uptake is determined by Abeta-aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia* 58, 1235–1246.
- Nishitsuji, K., Hosono, T., Uchimura, K., Michikawa, M., 2011. Lipoprotein lipase is a novel amyloid beta (Abeta)-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of Abeta in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 6393–6401.
- Nordberg, A., 2001. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol. Psychiatry* 49, 200–210.
- Padmanabhan, J., Levy, M., Dickson, D.W., Potter, H., 2006. Alpha1- antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in Alzheimer's disease brain, induces tau phosphorylation in neurons. *Brain* 129, 3020–3034.
- Park, K.W., Yoon, H.J., Kang, D.Y., Kim, B.C., Kim, S., Kim, J.W., 2011. Regional cerebral blood flow differences in patients with mild cognitive impairment between those who did and did not develop Alzheimer's disease. *Psychiatry Res.* 203, 201–206.
- Parri, H.R., Gould, T.M., Crunelli, V., 2001. Spontaneous astrocytic Ca $^{2+}$ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat. Neurosci.* 4, 803–812.
- Pasinetti, G.M., Aisen, P.S., 1998. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 87, 319–324.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., Carmignoto, G., 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 17, 7817–7830.
- Paterson, D., Nordberg, A., 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* 61, 75–111.
- Patil, S., Chan, C., 2005. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 384, 288–293.
- Patil, S., Sheng, L., Masserang, A., Chan, C., 2006. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 406, 55–59.
- Patil, S., Melrose, J., Chan, C., 2007. Involvement of astroglial ceramide in palmitic acid-induced Alzheimer-like changes in primary neurons. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2131–2141.
- Patil, S., Balu, D., Melrose, J., Chan, C., 2008. Brain region-specificity of palmitic acid-induced abnormalities associated with Alzheimer's disease. *BMC Res. Notes* 1, 20.
- Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–434.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Pekna, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci. Lett.* (pii: S0304-3940(14)00008-1). doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.071.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421–431.
- Perry, R.T., Collins, J.S., Wiener, H., Acton, R., Go, R.C., 2001. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 873–883.
- Petzold, G.C., Murthy, V.N., 2011. Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron* 71, 782–797.
- Piccini, A., Borghi, R., Guglielmotto, M., Tamagno, E., Cirmena, G., Garuti, A., Pollero, V., Cammarata, S., Fornaro, M., Messa, M., Colombo, L., Salmona, M., Perry, G., Tabaton, M., 2012. β -amyloid 1–42 induces physiological transcriptional regulation of BACE1. *J. Neurochem.* 122, 1023–1031.
- Pihlaja, R., Koistinaho, J., Malm, T., Sikkilä, H., Vainio, S., Koistinaho, M., 2008. Transplanted astrocytes internalize deposited β -amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* 56, 154–163.
- Pihlaja, R., Koistinaho, J., Kauppinen, R., Sandholm, J., Tanila, H., Koistinaho, M., 2011. Multiple cellular and molecular mechanisms are involved in human A β clearance by transplanted adult astrocytes. *Glia* 59, 1643–1657.
- Podlesniy, P., Figueiro-Silva, J., Llado, A., Antonell, A., Sanchez-Valle, R., Alcolea, D., Lleo, A., Molinuevo, J.L., Serra, N., Trullas, R., 2013. Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* [Epub ahead of print]. doi: 10.1002/ana.23955.
- Rao, J.S., Keleshian, V.L., Kleinm, S., Rapoport, S.I., 2012. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl. Psychiatry* 2, e132, <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2012.55>.
- Rosenberg, P.A., Aizenman, E., 1989. Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 103, 162–168.
- Rossner, S., Apelt, J., Schliebs, R., Perez-Polo, J.R., Bigl, V., 2001. Neuronal and glial β -secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology. *J. Neurosci. Res.* 64, 437–446.
- Rossner, S., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., Perez-Polo, J.R., 2005. Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *J. Neurochem.* 92, 226–234.
- Santello, M., Bezzi, P., Volterra, A., 2011. TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron* 69, 988–1001.
- Sastre, M., Klockgether, T., Henekam, M.T., 2006. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 167–176.
- Satoh, J., Kuroda, Y., 2001. Nicastrin, a key regulator of presenilin function, is expressed constitutively in human neural cell lines. *Neuropath* 21, 115–122.
- Sattler, R., Rothstein, J.D., 2006. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb. Exp. Pharmacol.* 175, 277–303.
- Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M.-X., Mayeux, R., Luchsinger, A., 2006. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 59, 912–921.
- Scemes, E., Giaume, C., 2006. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54, 716–725.
- Schuitmaker, A., Dik, M.G., Veerhuis, R., Scheltens, P., Schoonenboom, N.S., Hack, C.E., Blankenstein, M.A., Jonker, C., 2009. Inflammatory markers in AD and MCI patients with different biomarker profiles. *Neurobiol. Aging* 30, 1885–1889.
- Scimemi, A., Meabon, J.S., Woltjer, R.L., Sullivan, J.M., Diamond, J.S., Cook, D.G., 2013. Amyloid- β 1–42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *J. Neurosci.* 33, 5312–5318.

- Scott, H., Pow, D., Tannenberg, A., Dodd, P., 2002. Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 1–5.
- Scott, H.A., Gebhardt, F.M., Mitrovic, A.D., Vandenberg, R.J., Dodd, P.R., 2011. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32 (553), e1–e11.
- Seifert, G., Schilling, K., Steinhauser, C., 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 194–206.
- Selkoe, D.J., 1994. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 489–517.
- Serrano-Pozo, A., Mielke, M.L., Gómez-Isla, T., Betensky, R.A., Growdon, J.H., Frosch, M.P., Hyman, B.T., 2011. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 179, 1373–1384.
- Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M.G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D.L., Bryant, K., Fritz, L.C., Galasko, D., Thal, L.J., Lieberburg, I., Schenk, D.B., 1993. Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino-terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* 361, 260–263.
- Shaffer, L.M., Dority, M.D., Gupta-Bansal, R., Frederickson, R.C., Younkin, S.G., Brunden, K.R., 1995. Amyloid β protein (Ab) removal by neuroglial cells in culture. *Neurobiol. Aging* 16, 737–745.
- Shaftel, S.S., Kyriakides, S., Olschowska, J.A., Miller, J.N., Johnson, R.E., O'Banion, M.K., 2007. Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.* 117, 1595–1604.
- Sheng, J.G., Zhu, S.G., Jones, R.A., Griffin, W.S., Mrak, R.E., 2000. Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo. *Exp. Neurol.* 163, 388–391.
- Simard, M., Nedergaard, M., 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129, 877–896.
- Simpson, J.E., Ince, P.G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P.J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., Wharton, S.B., 2010. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol. Aging* 31, 578–590.
- Small, G.W., 1998. The pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* 59, 7–14.
- Smith, Q.R., Nagura, H., 2001. Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model. *J. Mol. Neurosci.* 16, 167–172.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.
- Solfrizzi, V., D'Introno, A., Colacicco, A.M., Capurso, C., Del Parigi, A., Capurso, S., Gadaleta, A., Capurso, A., Panza, F., 2005. Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia. *Exp. Gerontol.* 40, 257–270.
- Stutzmann, G.E., Caccamo, A., LaFerla, F.M., Parker, I., 2004. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J. Neurosci.* 24, 508–513.
- Styren, S.D., Kamboh, M.I., DeKosky, S.T., 1998. Expression of differential immune factors in temporal cortex and cerebellum: the role of alpha-1-antichymotrypsin, apolipoprotein E, and reactive glia in the progression of Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.* 396, 511–520.
- 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 upregulates TACE to enhance alpha-cleavage of APP in neurons: resulting decrease in A β production. *J. Neurochem.* 104, 1387–1393.
- Takano, T., Tian, G.F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., Nedergaard, M., 2006. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* 9, 260–267.
- Tang, Z., Pi, X., Chen, F., Shi, L., Gong, H., Fu, H., Qu, Z., 2012. Fifty percent reduced-dose cerebral CT perfusion imaging of Alzheimer's disease: regional blood flow abnormalities. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* 27, 267–274.
- Teakong, T., Graham, A., Court, J., Perry, R., Jaros, E., Johnson, M., Hall, R., Perry, E., 2003. Alzheimer's disease is associated with a selective increase in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes. *Glia* 41, 207–211.
- Thal, D.R., Schultz, C., Dehghani, F., Yamaguchi, H., Braak, H., Braak, E., 2000. Amyloid beta-protein (A β)-containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated A β deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathol.* 100, 608–617.
- Thal, D.R., 2012. The role of astrocytes in amyloid β -protein toxicity and clearance. *Exp. Neurol.* 236, 1–5.
- Thibault, O., Gant, J.C., Landfield, P.W., 2007. Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 6, 307–317.
- Thomas, T., Nadackal, T.G., Thomas, K., 2001. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit amyloid-beta aggregation. *NeuroReport* 12, 3263–3267.
- Veeraraghavulu, K., Zhang, C., Zhang, X., Tanzi, R.E., Sisodia, S.S., 2014. Age-dependent non-cell-autonomous deposition of amyloid from synthesis of β -amyloid by cells other than excitatory neurons. *J. Neurosci.* 34, 3668–3673.
- Vermeer, S.E., Prins, N.D., den Heijer, T., Hofman, A., Koudstaal, P.J., Breteler, M.M., 2003. Silent brain infarcts and the risk of dementia and cognitive decline. *N. Engl. J. Med.* 348, 1215–1222.
- Vinters, H.V., 1987. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke* 18, 311–324.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181–193.
- Wang, S.W., Wang, M., Grossman, B.M., Martin, R.J., 1994. Effects of dietary fat on food intake and brain uptake and oxidation of fatty acids. *Physiol. Behav.* 56, 517–522.
- Weggen, S., Eriksen, J.L., Das, P., Sagi, S.A., Wang, R., Pietrzik, C.U., Findlay, K.A., Smith, T.E., Murphy, M.P., Bulter, T., Kang, D.E., Marquez-Sterling, N., Golde, T.E., Koo, E.H., 2001. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414, 212–216.
- Weggen, S., Eriksen, J.L., Sagi, S.A., Pietrzik, C.U., Ozols, V., Fauq, A., Golde, T.E., Koo, E.H., 2003. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid (beta) 42 production by direct modulation of (gamma)-secretase activity. *J. Biol. Chem.* 278, 31831–31837.
- Weller, R.O., Boche, D., Nicoll, J.A., 2009. Microvasculature changes and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and their potential impact on therapy. *Acta Neuropathol.* 118, 87–102.
- Weller, R.O., Subash, M., Preston, S.D., Mazanti, I., Carare, R.O., 2008. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 18, 253–266.
- Wevers, A., Monteggia, L., Nowacki, S., Bloch, W., Schutz, U., Lindstrom, J., Pereira, E.F., Eisenberg, H., Giacobini, E., de Vos, R.A., Steur, E.N., Maelicke, A., Albuquerque, E.X., Schroder, H., 1999. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the cerebral cortex in Alzheimer's disease: histotopographical correlation with amyloid plaques and hyperphosphorylated-tau protein. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2551–2565.
- Wharton, S.B., O'Callaghan, J.P., Savva, G.M., Nicoll, J.A., Matthews, F., Simpson, J.E., Forster, G., Shaw, P.J., Brayne, C., Ince, P.G., MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group, 2009. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement. Geriatr. Cognit. Disord.* 27, 465–473.
- WHO, 2012. Dementia: A Public Health Priority. World Health Organization.
- Wood, J.A., Wood, P.L., Ryan, R., Graff-Radford, N.R., Pilapil, C., Robitaille, Y., Quirion, R., 1993. Cytokine indexes in Alzheimers temporal cortex no changes in mature IL-1 beta to IL-1RA but increases in the associated acute-phase proteins IL-6, Alpha-2 macroglobulin and C-reactive protein. *Brain Res.* 629, 245–252.
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., Husemann, J., 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid- β in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9, 453–457.
- Wyss-Coray, T., 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* 12, 1005–1015.
- Yang, Y., Quitschke, W.W., Brewer, G.J., 1998. Upregulation of amyloid precursor protein gene promoter in rat primary hippocampal neurons by phorbol ester IL-1 and retinoic acid, but not by reactive oxygen species. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 60, 40–49.
- Yermakova, A.V., O'Banion, M.K., 2001. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 823–836.
- Yin, K.J., Cirrito, J.R., Yan, P., Hu, X., Xiao, Q., Pan, X., Bateman, R., Song, H., Hsu, F.F., Turk, J., Xu, J., Hsu, C.Y., Mills, J.C., Holtzman, D.M., Lee, J.M., 2006. Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. *J. Neurosci.* 26, 10939–10948.
- Yu, W.F., Nordberg, A., Ravid, R., Guan, Z.Z., 2003. Correlation of oxidative stress and the loss of the nicotinic receptor alpha 4 subunit in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 338, 13–16.
- Yu, W.F., Guan, Z.-Z., Bogdanovic, N., Nordberg, A., 2005. High selective expression of $\alpha 7$ nicotinic receptors on astrocytes in the brains of patients with sporadic Alzheimer's disease and patients carrying Swedish APP 670/671 mutation: a possible association with neuritic plaques. *Exp. Neurol.* 192, 215–225.
- Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., Manley, G.T., 2009. Role of aquaporin-4 in cerebral edema ans stroke. *Handb. Exp. Pharmacol.* 190, 159–170.
- Zhang, Y.W., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H., 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* 4, 3.
- Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., Logan, S., Maus, E., Citron, M., Berry, R., Binder, L., Vassar, R., 2007. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.* 27, 3639–3649.
- Zhao, J., O'Connor, T., Vassar, R., 2011. The contribution of activated astrocytes to A β production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neuroinflammation* 8, 150.
- Zhao, J., Paganini, L., Mucke, L., Gordon, M., Refolo, L., Carman, M., Sinha, S., Oltersdorf, T., Lieberburg, I., McConlogue, L., 1996. β -Secretase processing of the β -amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 31407–31411.
- Zhou, Y., Su, Y., Li, B., Liu, F., Ryder, J.W., Wu, X., Gonzalez-DeWhitt, P.A., Gelfanova, V., Hale, J.E., Zou, J., Wang, Y.X., Dou, F.F., Lu, H.Z., Ma, Z.W., Lu, P.H., Xu, X.M., 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem. Int.* 56, 577–584.
- Zlokovic, B.V., 2014. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738.
- Zou, J., Wang, Y.X., Dou, F.F., Lu, H.Z., Ma, Z.W., Lu, P.H., Xu, X.M., 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem. Int.* 56, 577–584.