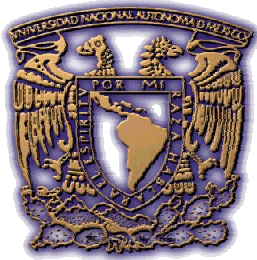


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMEDICAS

“IDENTIFICACIÓN DE PROTEINAS QUE SE
UNEN AL PÉPTIDO $A\beta_{1-42}$ UTILIZANDO
BIBLIOTECAS DE DNAC DE CEREBRO DE
PACIENTE CON LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER”

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

JORGE ORDÓÑEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

A mi comité tutorial: Dra. Rosalinda Guevara Guzmán, Dr. Mario Luíz Calcagno Montáns, Dr. Horacio Reyes Vivas y Dr. Luíz Vaca Domínguez

A CONACYT por otorgarme una beca con número de registro 189755 para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

Este proyecto recibió el apoyo IN-203706 y IN-200907 proporcionado por DGAPA y el AG-023534 proporcionado por NIH.

**El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biología
Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones
Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Karen Manoutcharian Airapetian.**

A mis padres: María Eugenia y Jorge

A mis hermanas: Paty y Liliana

A Nelia

Agradecimientos

A mis padres y a mis hermanas por que juntos hemos salido de las situaciones difíciles y juntos hemos disfrutado de los buenos tiempos y cuyo apoyo ha sido vital en mi vida.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Karen Manoutcharian por todo su apoyo el la realización de este proyecto, por su confianza, por todos sus conocimientos que no solo me han hecho crecer como profesional si no como persona.

A la Dra. Goar Gevorkian, por su apoyo incondicional y por hacerme ver mis errores a largo de la realización de este proyecto de investigación.

Al Gonzalo Acero Galindo y a Maria Elena Munguía Zamudio por la asesoría técnica durante la realización de este trabajo.

A Nelia, por el apoyo y por todos los momentos felices que hemos pasado y por todos los que nos quedan por vivir.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias de toda la vida: Nelia, Arturo, Brenda, Aldo, Leonardo, Sergio, Edgardo, Ezequiel, Laura, Alfredo, Luci, Hiram, Anidia, Edgar, Ángel, Blanca, Juan, Mario, Saúl, Alejandra, Jazmin, Otero, Orestes, Tania, Hugo, por que sin ellos, nada de esto sería posible.

A mis tíos de Irapuato: Andrea, Juan, Norma, Lupe, Fernando, Olga, Martha, Miguel, Lola, Filiberto, Carlos, Luís y Santos.

A mis primos: Betsy, Pancho, Michel, Selene, Karen, Gisela, Kevin, Miguel, Fernando, Liz, Sharon, Miriam.

A mis abuelos: Esperanza, Carlos, Silvestre✠ y Francisco✠.

INDICE

Resumen	4
Abstract	6
ANTECEDENTES	
1. La Enfermedad de Alzheimer	7
2. Alteraciones Neuropatológicas	8
2.1 Depósitos de A β	9
2.1.1 Placas seniles	9
2.1.2 Placas difusas	10
2.1.3 Depósitos intracelulares	11
2.1.4 Depósitos cerebrovasculares	12
2.2 Marañas Neurofibrilares	12
2.3 Otras lesiones	14
3. El papel patogénico del péptido A β en la Enfermedad de Alzheimer	14
3.1 Procesamiento de APP	15
4. Estructura del péptido A β	18
5. Interacciones de A β con otras proteínas	18
6. Genética de la Enfermedad de Alzheimer	20
7. Factores de riesgo	21
8. Estrés oxidativo	21
9. Alteraciones en la homeostasis de calcio	22
10. Acercamientos terapéuticos	23
11. Phage display	24
11.1 Tipos de bibliotecas obtenidas por phage display	27
11.1.1 Bibliotecas de péptidos	27
11.1.2 Bibliotecas genómicas y de ADNc	28
11.1.3 Bibliotecas de anticuerpos	29
OBJETIVOS	
• Objetivo general	30
• Objetivos particulares	30

MATERIAL Y METODOS

- Construcción de la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer 31
- Selección de clonas positivas contra el péptido A β ₁₋₄₂ biotinilado por medio de la técnica de bioselección. 33
- Tamizaje por ELISA de las clonas obtenidas en la segunda ronda de bioselección. 34
- Secuenciación del DNA de las clonas positivas. 35
- Mapeo de reactividad de la clona positiva obtenida en la segunda ronda de bioselección contra el péptido A β . 36
- ELISA de competencia 37
- Clonación del inserto proveniente de la clona MAPJ en el vector pGEX-4T-1 38
- Inmunolocalización de A β ₁₋₄₂ y MAP1B 39

RESULTADOS

- Construcción de la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer expresada en fago filamentoso M13. 40
- Bioselección de la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer. 41
- Tamizaje por ELISA de los fagos eluidos de la segunda ronda de bioselección. 42
- Secuenciación de las clonas reactivas 43

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 51

PERSPECTIVAS 59

BIBLIOGRAFIA 61

RESUMEN

Se ha demostrado que la formación de depósitos extracelulares e intraneuronales del péptido beta amiloide ($A\beta$) están involucrados en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (EA). A pesar de esto, el mecanismo neurotóxico exacto de $A\beta$ no se ha comprendido del todo. El estudio de las interacciones del péptido $A\beta$ con otras proteínas, ha sido un tema de gran interés, ya que con esto se puede esclarecer el mecanismo neurotóxico de $A\beta$.

En el presente estudio se seleccionaron péptidos que se unen a $A\beta_{1-42}$ a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer expresada en superficie de fago filamentoso M13. A partir de las clonas obtenidas en la segunda ronda de bioselección, se identificaron tres que se unen $A\beta_{1-42}$ según los ensayos de tamizaje por ELISA. El alineamiento de las secuencias de nucleótidos, demostró que las tres clonas compartían la misma secuencia. Análisis posteriores por medio de bases de datos electrónicos, tanto de las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos, demostró que dichas secuencias tienen una homología del 100 % con la proteína de asociación a microtúbulos MAP1B. Por lo anterior se decidió nombrar a las tres clonas con el nombre de MAPJ.

El fragmento de MAP1B expresado en la superficie de la clona MAPJ y que interactúa con $A\beta_{1-42}$ consta de 142 aminoácidos con múltiples copias del motivo KKEE y KKEI/V y comparte el 100 % de similitud con el dominio de unión a microtúbulos presente en la cadena pesada de MAP1B de humano. En el mapeo que se hizo de la clona MAPJ con los fragmentos del péptido $A\beta_{1-42}$ se observó esta clona solo era reactiva al péptido de 42 aminoácidos, lo cual sugiere que MAPJ esta reconociendo una conformación del péptido en lugar e una secuencia lineal.

En este trabajo se propone que la interacción de $A\beta_{1-42}$ con el dominio de unión a microtúbulos de MAP1B puede estar participando directamente con las alteraciones a nivel de citoesqueleto encontradas en la EA. Es importante determinar si estas alteraciones son causales de la enfermedad o si solo representan un evento secundario asociado a la muerte de las neuronas, aun así, estos eventos parecen estar jugando un papel importante, no solo en la EA si no en otras enfermedades neurodegenerativas.

Abstract

It has been demonstrated that the formation of extracellular and intraneuronal deposits of amyloid beta peptide ($A\beta$) is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). In spite of this, the exact mechanism of $A\beta$ neurotoxicity has not been understood completely. The study of the interactions of the $A\beta$ peptide with other proteins has been a subject of great interest, allowing to clarify the mechanisms of $A\beta$ neurotoxicity.

In the present study, we have isolated peptides that bind to $A\beta_{1-42}$ by the screening of a human brain cDNA library from a patient with AD, expressed on M13 filamentous phage. Three phage clones were obtained from the second round of biopanning that bind to $A\beta_{1-42}$ according to ELISA. The nucleotide sequence alignment demonstrated that the three phage clones shared the same sequence. Later analyses with electronic data bases demonstrated that these sequences have a 100% of homology with the microtubule associated protein 1B (MAP1B). Therefore, the previous phage clones were named MAPJ.

The fragment of MAP1B expressed in the surface of the phage clone MAPJ and that interacts with $A\beta_{1-42}$ consists of 142 amino acids containing multiple copies of the motif KKEE and KKEI/V and shares 100 % of similarity with the microtubule binding domain present in the heavy chain of MAP1B. In mapping studies we found that the MAPJ clone only binds to $A\beta_{1-42}$, which suggests that MAPJ recognize some conformations of the peptide instead of linear sequences.

In this study we propose that the interaction of $A\beta_{1-42}$ with the microtubule binding domain of MAP1B can be directly participating with the alterations in the cytoskeleton found in AD. It is important to determine if these alterations have a causal role in the disease or only represent a secondary event associated with the neuronal death in AD as well as in other neurodegenerative disorders.

ANTECEDENTES

1. La Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva en la cual, los pacientes presentan deterioro progresivo de la memoria, desordenes en las funciones cognitivas, alteraciones en el comportamiento (paranoia y alucinaciones), un decremento en las funciones lingüísticas, desorientación espacio-temporal y por último la muerte (Selkoe, 2001). Se ha estimado que aproximadamente entre 20 y 30 millones de personas de la tercera edad, de todo el mundo, presentan esta enfermedad y se predice que para el 2050 el número de enfermos se puede triplicar. En México, esta enfermedad afecta a 350 mil personas y mueren anualmente 2050 pacientes, convirtiendo a la enfermedad de Alzheimer en la cuarta causa de muerte en personas mayores de 65 años (<http://www.innn.edu.mx>).

La mayor parte de la pérdida neuronal en la EA se presenta en regiones del cerebro involucradas en procesos de aprendizaje y memoria como la capa II de la corteza entorrinal, las neuronas CA1 del hipocampo y en las cortezas frontal, parietal y temporal (Figura 1). No esta muy claro por que son estas regiones las más afectadas, algunos autores argumentan que esto puede estar relacionado con la regulación de ciertos genes entre los que se encuentran los receptores de glutamato, proteínas de unión a calcio y factores tróficos que a su vez pueden prevenir o promover la muerte de las neuronas (Mattson, 2004). Por otro lado, no solo el número de las neuronas se ve reducido drásticamente sino también se observa una marcada disminución en la densidad sináptica (Snyder et al., 2005).

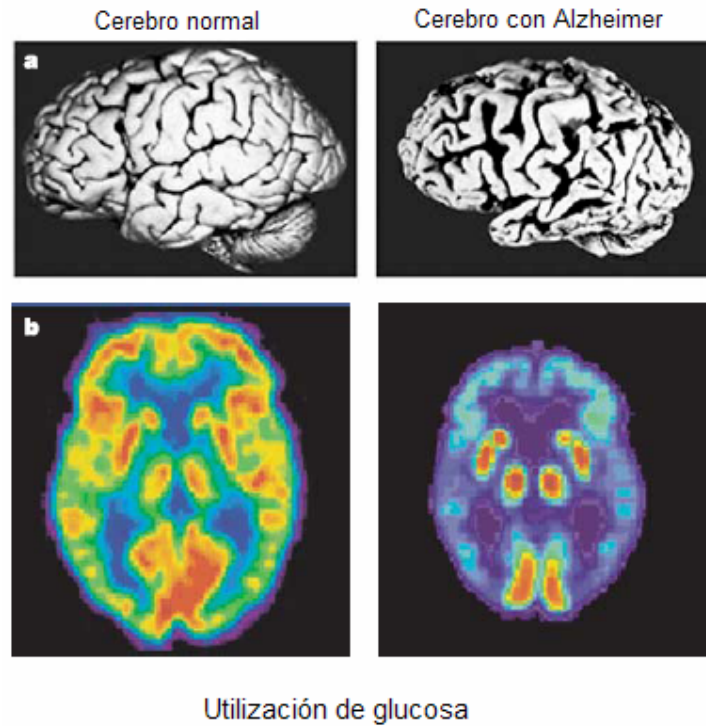


Figura. 1. Comparación entre un cerebro de una persona sana y un paciente con la enfermedad de Alzheimer, el cual presenta contracción de de los lóbulos temporales y frontales (a). Tomografía por emisión de positrones (TEP) que muestra la utilización de glucosa (las áreas en rojo y amarillo indican las áreas del cerebro con altos niveles de utilización de glucosa) en un paciente normal y en otro con la enfermedad de Alzheimer. El paciente con la EA muestra un decremento en el metabolismo energético en la corteza frontal y los lóbulos temporales. (Tomado de Mattson, 2004).

2. Alteraciones Neuropatológicas

Las dos principales lesiones macroscópicas encontradas en los cerebros de pacientes con la EA son las placas seniles y las marañas neurofibrilares, las cuales se encuentran en mayor número en sujetos con la enfermedad en comparación con aquellos con un proceso de envejecimiento normal (Mattson, 2004).

2.1 Depósitos de A β

Se han encontrado cuatro tipos de depósitos del péptido beta amiloide (A β) en cerebros de pacientes con la EA, los cuales ocupan del 12 al 25 % del volumen total del cerebro (Morgan et al., 2004), estos depósitos son conocidos como placas seniles, placas difusas, depósitos intracelulares y depósitos cerebrovasculares.

Existen evidencias que sugieren que la acumulación progresiva del péptido A β en la corteza límbica y de asociación se lleva a cabo antes de la formación de las placas seniles y las marañas neurofibrilares, lo cual da inicio a una compleja cascada de cambios bioquímicos y celulares que culminan en un marcado deterioro cognitivo y de la memoria en los pacientes con la EA (Selkoe, 2001, Hardy y Allsop, 1991).

2.1.1. Placas seniles

Las placas seniles son estructuras extracelulares esféricas alrededor de los 50 a 200 nm de diámetro con un centro denso compuesto por el péptido A β , principalmente en formas filamentosas y rodeadas por neuritas distróficas (Selkoe, 2001). El fragmento mas abundante del péptido es el A β ₁₋₄₀, el cual representa cerca del 90 % del total de péptido A β , un 10 % es representado por el fragmento A β ₁₋₄₂, mientras que los fragmentos A β ₁₋₃₉ y A β ₁₋₄₃ son observados en cantidades muy bajas (Morgan et al., 2004).

Por otro lado, varias formas truncadas en la región amino-terminal de A β (NTA β) han sido identificadas en cerebro, sobrenadante de cultivo celular y fluido cerebrospinal por medio de diferentes metodologías (Sergeant, 2003). Las formas NTA β han sido descritas en el 35 % de los cerebros de pacientes con la EA. Estas formas truncadas representan mas del 60 % de todas las especies de A β y funcionan como núcleo para la oligomerización y depósito del péptido, lo cual trae como consecuencia un marcado daño axonal y dendrítico (Selkoe y Schenk 2003).

A pesar de que el péptido A β es el principal componente de las placas seniles, se han tratado de determinar otros componentes que pueden afectar o promover su formación. En el 2002, se determinó que CLAC (collagen-like Alzheimer amyloid plaque component), así como su precursor, CLAC-P/collagen type XXV (Col XXV) forman parte de las placas seniles en la EA (Hashimoto et al., 2002), en la actualidad no se conoce la actividad biológica de CLAC y el papel que este juega en la formación de las placas seniles. Por otro lado, se ha demostrado que la apolipoproteína D se encuentra presente en placas seniles localizadas en la corteza temporal de pacientes con la EA (Desai et al., 2005).

2.1.2. Placas difusas

Las placas difusas son estructuras amorfas, no poseen un centro denso de A β pero por medio de anticuerpos se ha determinado que este se encuentra presente y tal vez en un estadio temprano de agregación (Tagliavini et al., 1988, Dickson, 1997). Estas estructuras usualmente son encontradas a lo largo de los hemisferios cerebrales y en menor grado en el cuerpo estriado y la corteza cerebelar (Morgan et al., 2004)

2.1.3 Depósitos intracelulares

Hasta 1993, se creía que la acumulación de A β era exclusivamente extracelular debido a que las técnicas de biología celular utilizadas hasta antes de este año no permitían demostrar la presencia del péptido dentro de las células, lo anterior llevo a pensar a los investigadores que la generación de A β se llevaba a cabo en la membrana plasmática de las células justo antes de ser liberado al medio intercelular.

En el año de 1993 fue cuando se publicó la primera evidencia bioquímica de que A β también se encontraba en niveles considerables dentro de neuronas humanas (Wertkin et al., 1993). Trabajos posteriores demostraron que esta poza de A β dentro de las líneas celulares neuronales incrementaba en relación con la maduración así como con el tiempo de cultivo de las células utilizadas en estos experimentos (Turner, R. S et al., 1996, Skovronsky et al., 1998).

Una vez realizados estos descubrimientos distintos grupos de investigación que se dieron a la tarea de determinar los organelos celulares involucrados en la producción de A β dentro de las neuronas. Entre los organelos responsables de esta producción se encuentran el retículo endoplásmico (Cook et al., 1997, Hartmann et al., 1997), aparato de Golgi (Xu et al., 1997, Xia et al., 2000) y el sistema endosomal-lisosomal (Koo y Squazzo, 1994, Cataldo et al., 2000, Pasternak et al., 2004). Aunque no se tienen datos de cual de estos organelos es el más importante en la producción de A β , la idea de que el péptido esta jugando un papel importante en la EA es ampliamente aceptada en la actualidad (Hartmann, 1999, Wilson et al., 1999).

2.1.4. Depósitos cerebrovasculares

Otro trastorno observado frecuentemente en pacientes con la EA es la angiopatía congofilica amiloide, la cual es originada debido al depósito de A β en los pequeños vasos sanguíneos de las meninges y la corteza cerebral, principalmente en las paredes externas de las arteriolas y los capilares (Selkoe, 2001). Este tipo de depósitos no son considerados como característicos de la EA, ya que, a pesar de ser observados en pacientes con esta enfermedad, también son observados en pacientes que no presentan síntoma alguno de demencia (Glenner et al., 1981).

2.2 Marañas Neurofibrilares

Las marañas neurofibrilares son agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada y con modificaciones oxidativas (Mattson, 2004). En condiciones normales, tau es una proteína de asociación a los microtúbulos, la cual participa en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos de las neuronas, principalmente en los axones (Weingarten et al., 1975, Binder et al., 1984)

La proteína tau es el producto de la traducción de un único gen, localizado en el cromosoma 17 (Buee et al., 2000). Después de transcribirse, se puede procesar de diferentes maneras y originar seis isoformas en las neuronas del sistema nervioso central (SNC). Existe una isoforma de mayor tamaño que solamente es expresada en el sistema nervioso periférico (SNP) (Couchie et al., 1992).

Las isoformas de tau presentes en el SNC difieren entre sí en el número de regiones de unión a microtúbulos y en una región de 29 aminoácidos en el extremo amino-terminal. Por otro lado, existe una forma corta de la proteína tau que se encuentra presente solamente en el cerebro fetal, la cual tiene solamente tres regiones de unión a los microtúbulos y no tiene la región de 29 residuos aminoácidos en el extremo N-terminal (Goedert et al., 1989).

Tau es sintetizada principalmente en neuronas (Kosik et al., 1989), pero también se encuentra presente en astrocitos (Papasozomenos et al., 1989), oligodendrocitos (LoPresti et al., 1995) y tejidos periféricos (Lubke et al., 1994). Más de diez mutaciones han sido descritas en el gen tau en familias que presentan demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17) (Buee et al., 2000). Neuropatológicamente los pacientes con FTDP-17 presentan atrofia de los lóbulos frontales y temporales, alteraciones en la proteína tau, gliosis y muerte neuronal (Delacourte, 2005)

La fosforilación de la proteína tau es mayor en organismos fetales en comparación con organismos adultos. Entre las cinasas encargadas de regular el estado de fosforilación de tau se encuentran las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Drewes et al., 1992), la cinasa dependiente de ciclinas 5 (cdk5) (Baumann et al., 1993) y GSK3 (Mandelkow et al., 1992).

Las marañas neurofibrilares (MNF's) están compuestas por filamentos helicoidales pareados (FHP) de 8 a 20 nm de la proteína tau principalmente, aunque también presentan inmunoreactividad para anticuerpos dirigidos contra la proteína de asociación a microtúbulos 1B (MAP1B) (Hasegawa et al., 1990), ubiquitina (Perry et al., 1987), nexina I (Rosenblatt, et al., 1989) y A β (Perry et al., 1992).

Este tipo de lesión también se encuentra en otras enfermedades degenerativas como es la Degeneración corticobasal, Enfermedad de Pick, Esclerosis lateral Amiotrófica, Síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker, Enfermedad Hallervorden-Spatz, Distrofia miotónica, así como en la Enfermedad de Niemann-Pick (Buee et al., 2000), por mencionar algunas.

2.3 Otras lesiones

Otras lesiones observadas en exámenes post-mortem de cerebros de pacientes con la EA son los cuerpos de Lewy (Kazee y Han, 1995, Ronald y Hamilton, 2000) y cuerpos de Hirano. Estos últimos se encuentran principalmente en neuronas piramidales del hipocampo (Hirano, 1994).

3. El papel patogénico del péptido A β en la Enfermedad de Alzheimer

En 1984 Glenner y Wong encontraron, en un análisis cerebrovascular realizado a pacientes con la EA y síndrome de Down, una proteína de 4 kDa la cual llamaron beta amiloide (A β) (Glenner y Wong, 1984). A β se produce a través del procesamiento proteolítico de una glicoproteína de membrana tipo I conocida como "proteína precursora amiloide" o APP. APP presenta varias isoformas que van desde 695 (APP695) hasta 770 residuos aminoácidos (APP770), la forma más abundante en el cerebro (APP695) es producida principalmente en las neuronas y difiere de las formas largas en que, la forma corta de APP, carece de la secuencia inhibidora de proteasas tipo Kunitz (Mattson, 1997; Hardy, 1997). La principal función de APP770 es la de estimular la proliferación de células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP) (Alvarez et al., 1995).

3.1 Procesamiento de APP

Como se mencionó anteriormente, APP es procesada proteolíticamente. En este procesamiento intervienen tres diferentes enzimas conocidas como: α , β y γ -secretasas (Selkoe, 2001).

El corte secuencial de la α -secretasa y la γ -secretasa promueve la ruta no amiloidogénica del procesamiento, es decir, no hay producción de $A\beta$ ya que α -secretasa corta entre los residuos 16 y 17 dentro de la región $A\beta$, por lo cual $A\beta$ no puede ser liberado. El corte de la α -secretasa produce un fragmento denominado $APP_{s-\alpha}$, al cual se le han asignado varias funciones *in vitro* e *in vivo*, entre las cuales destacan las de factor neurotrófico y neuroprotector (Edbauer et al., 2003). Además, se ha observado que la producción del fragmento $APP_{s-\alpha}$ aumenta en respuesta a la actividad eléctrica y a la activación de los receptores muscarínicos de acetilcolina (Mattson, 1997).

El otro producto del procesamiento de la α -secretasa es un péptido C-terminal de 83 aminoácidos (C83), posteriormente la γ -secretasa corta a este fragmento para producir un pequeño fragmento hidrofóbico conocido como p3, cuyo papel en la enfermedad de Alzheimer no está bien establecido (Selkoe y Schenk, 2003), y otro denominado dominio AICD, el cual se puede unir a la proteína adaptadora citoplasmática Fe65 y aparentemente colaborar con mecanismos de señalización nuclear (Kimberly et al., 2001) (Figura 2).

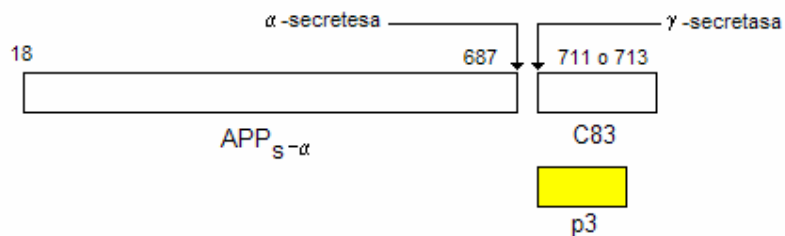
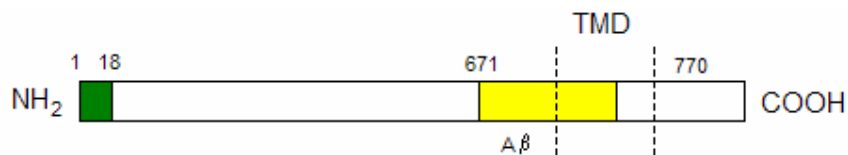


Figura 2. Ruta no amiloidogénica del procesamiento de APP

En la ruta amiloidogénica, la β -secretasa (aspartil proteasa también conocida como BACE) corta después del residuo 671 de la proteína precursora amiloide, lo que da como resultado la liberación del ectodominio $APP_{s-\beta}$ y un fragmento C-terminal de 99 residuos de aminoácidos (C99). La actividad de la γ -secretasa, la cual en su sitio activo tiene a la presenilina, nicastrina, Aph-1 y Pen-2, corta a C99 en el residuo 711 o 713, originando así al péptido $A\beta$ en sus dos tamaños mas comunes: $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$. Algunos autores sugieren que APP puede jugar un papel importante en la transmisión y mantenimiento neuronal, así como en la función sináptica; su inadecuado procesamiento puede estar involucrado en la neurodegeneración (Honer, 1999) (Figura 3).

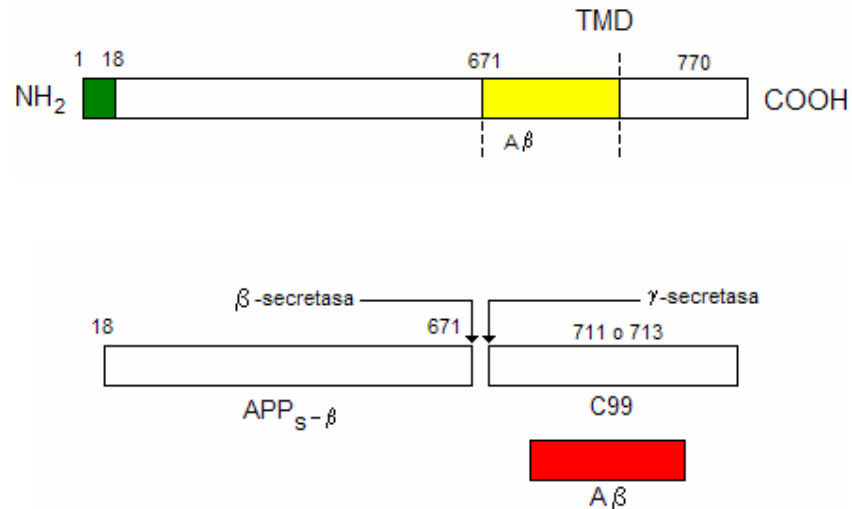


Figura 3. Ruta amiloidogénica del procesamiento de APP.

Los descubrimientos anteriores llevaron a varios autores a formular lo que hoy se conoce como la "hipótesis amiloide", actualmente, esta permanece controversial, principalmente debido a que no existe una correlación clara en los patrones de depositación, espaciales y temporales del péptido Aβ, con el grado clínico de demencia en la EA. En contraste, la declinación cognitiva correlaciona muy bien con la pérdida sináptica. Los datos anteriores han llevado a los investigadores a postular lo que se conoce como la "hipótesis sináptica del péptido Aβ". Esta hipótesis da mayor énfasis al papel patogénico que juegan los oligómeros no fibrilares del péptido, específicamente en las sinapsis (Tanzi, 2005).

Esta hipótesis es apoyada con varios trabajos, el primero se realizó en ratones transgénicos APP-V717 (PD-APP) en los cuales se observaron alteraciones sinápticas antes de desarrollar depósitos de Aβ (Larson et al., 1999), en el segundo trabajo se encontró que las formas oligoméricas no fibrilares del péptido Aβ, bloquean la potenciación a largo plazo (LTP) en cortes de cerebro y en ratones PD-APP vivos (Walsh et al., 2002a), por último, se ha reportado que los oligómeros solubles de Aβ, incluyendo dímeros y trímeros, son suficientes para inducir alteraciones en el aprendizaje y comportamiento de ratones transgénicos TG2576 (Cleary et al., 2005).

4. Estructura del péptido A β

Existe evidencia de que las especies neurotóxicas del péptido A β no son las formas fibrilares, como anteriormente se suponía, sino las formas oligoméricas con estructura β -plegada, la cuales pueden estar jugando un papel determinante en la patogénesis de la EA (Walsh et al., 2002a, Walsh et al., 2002b, Cleary et al., 2005, Xu et al., 2005). La estructura secundaria adoptada por A β depende principalmente del ambiente. Por medio de diversos experimentos se ha demostrado que los monómeros de A β presentan una estructura α -hélice en un ambiente similar al encontrado en las membranas de la célula (Coles et al., 1998). En contraste, cuando el ambiente es acuoso, el plegamiento es al azar con la presencia de estructuras α -hélice y β -plegada (Zhang et al., 2000), este cambio en la estructura, puede ser fundamental para las propiedades amiloidogénicas del péptido (Reinhard et al., 2005). En el 2005, Xu y colaboradores determinaron por medio dinámicas moleculares, que los residuos 24-37 de A β_{1-40} (en solución acuosa), son el punto de formación de la estructura β -plegada, en particular cuatro glicinas (G₂₅, G₂₉, G₃₃ y G₃₇). La sustitución de estas glicinas por alaninas incrementó la estabilidad de la estructura α -hélice (Xu et al., 2005).

5. Interacciones de A β con otras proteínas.

El estudio de las interacciones del péptido A β con otras proteínas, ha sido un tema de gran interés entre los investigadores, ya que el estudio de las interacciones proteína-proteína puede esclarecer el mecanismo neurotóxico de A β , el cual, en la actualidad, no es comprendido del todo.

En tabla 1 se enumeran las principales proteínas que interactúan con el A β y el efecto que produce esta interacción en el organismo.

Tabla 1. Proteínas que interactúan con el péptido A β

Proteína que interactúa con Aβ	Efecto de la interacción	Especies del péptido Aβ involucradas en la interacción	Referencia
SECR (Serpin-enzyme complex receptor)	Mediador en la internalización y degradación del péptido A β	Monómeros	Joslin et al., 1991 Boland et al., 1995
FPRL1 (Formal peptide receptor-like 1)	Interviene en los procesos inflamatorios observados en la EA	Monómeros y fibrilar	Le et al., 2001
Receptor de Insulina	Alteraciones en el metabolismo de la glucosa	Monómeros	Xie et al., 2002
p75 ^{NTR} (75 kD-neurotrophin receptor)	Protege a las células cuando son expuestas a altas concentraciones de A β	Fibrilar	Kuner et al., 1998 Zhang et al., 2003
α 7nAChR (α 7 nicotinic acetylcholine receptor)	Inhibe la liberación de acetilcolina así como el flujo de calcio en las neuronas	Monómeros y fibrilar	Wang et al., 2000
Integrinas	Modulación de las integrinas neuronales,	Monómeros y fibrilar	Sabo et al., 1995
RAGE (Receptor of advanced glycation end products)	Generación de especies reactivas de oxígeno y activación microglial.	Monómero y Fibrilar	Yan et al., 1997
Transtirretina	Inhibe los efectos del péptido A β	No especificado	Stein et al., 2004
LRP (Low-density lipoprotein receptor protein)	Bloqueo de los receptores LRP (eliminación de A β del cerebro)	Fibrilar	Deane et al., 2004
ERAB (Endoplasmic Reticulum associated amyloid beta-peptide binding)	Disfunción mitocondrial, producción	No especificado	Opermann et al., 1999 Lustbader et al 2004
Enzima ND3 (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3)	Inhibición del complejo I de cadena de transporte de electrones	Fibrilar	Munguía et al., 2006

6. Genética de la Enfermedad de Alzheimer

Una vez que se determinó la secuencia de aminoácidos de A β , el gen que codifica para la proteína precursora amiloide fue clonado y localizado en el cromosoma 21. Posteriormente el análisis de muestras de DNA de linajes que heredaban predominantemente la EA permitieron identificar por lo menos cinco mutaciones de APP (Hardy, 1997). Los genes de la presenilina 1 y 2 son otros dos genes claramente relacionados con la EA (Serrington et al., 1995); mutaciones en estos genes, causan la forma más agresiva de la enfermedad, la cual aparece entre los 40 y 50 años y raramente a edades más tempranas (Selkoe y Schenk, 2003). Las mutaciones presentes en los genes de ambas presenilinas provocan un incremento en la producción del péptido A β de 42 aminoácidos (A β ₁₋₄₂) (Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad., et al 1995).

Otro factor genético de predisposición a la enfermedad, es la proteína transportadora de colesterol, la apolipoproteína E (apoE), la cual presenta 3 alelos (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4) que codifican para tres diferentes isoformas de la proteína (Strittmatter et al., 1993). Algunos estudios genéticos han demostrado que la herencia de uno de los dos alelos ϵ 4 aumenta, de 2 a 5 veces, la probabilidad de desarrollar EA en etapas tempranas de la vida de una persona y la herencia de los dos alelos incrementa entre 4 y 10 veces mas el riesgo de presentar la enfermedad (Hahley y Wall, 2000). El mecanismo por el cual el alelo ϵ 4 promueve el desarrollo de la enfermedad no es muy claro, pero existe evidencia que éste incrementa la agregación y reduce la eliminación de A β (Mattson, 2004). En 1997, Pericak y colaboradores realizaron un tamizaje genómico de familias con la EA mayores a los 60 años de edad, en este trabajo, los autores proponen al cromosoma 12 como portador de un nuevo gen de susceptibilidad para la EA (Pericak-Vance et al., 1997). En el 2003, Ono y colaboradores, mapearon en este mismo cromosoma al gen *ali1*, el cual codifica para una proteína transmembranal involucrada en la supervivencia de las neuronas granulares cerebelares, estos autores sugieren que mutaciones en el gen *ali1* pueden estar involucradas en la EA (Ono et al., 2003).

Otro locus de predisposición para presentar la EA ha sido localizado en el cromosoma 10, pero el gen responsable, en la actualidad no ha sido establecido (Tanzi y Bertram, 2001).

7. Factores de riesgo

El principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad es la edad, pero diversos estudios epidemiológicos sugieren que un nivel de educación bajo, historial de lesiones en la cabeza, dietas con un consumo alto de grasas y calorías, así como un estilo de vida sedentario, puede incrementar considerablemente el riesgo de presentar la enfermedad (Mayeux, 2003; Mattson, 2003). En un estudio realizado en el 2004 por Lee y colaboradores observaron que cuando mantenían a ratones en un ambiente cognitivamente estimulante o con un régimen de restricción calórica, las neuronas del hipocampo son más resistentes a la muerte y presentan un incremento en la neurogénesis (Lee et al., 2002). También se ha reportado que las dietas que incluyen lípidos y metales como el cobre y hierro son un factor de riesgo para presentar la EA (Mayeux, 2003; Bush et al., 2003).

8. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo, es decir, la producción desmedida de especies reactivas de oxígeno y el deterioro del metabolismo energético de cierto tipo de neuronas son características de varias enfermedades neurodegenerativas. Las neuronas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer presentan cantidades anormalmente altas de proteínas, lípidos y ADN oxidados, dicho daño molecular mediado por la presencia de radicales libres es particularmente mayor en un ambiente con placas y marañas neurofibrilares.

Se ha propuesto que la principal fuente de estrés oxidativo en la EA es la interacción de A β con diferentes metales, principalmente Fe²⁺ y Cu⁺ (Smith et al., 1997; Bush et al., 2003), se ha documentado que durante la agregación de A β hay un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno y dicho proceso es potenciado por la presencia de Fe²⁺ y Cu⁺ (Morgan et al., 2000). El 4-hidroxinonenal, producto de la peroxidación de lípidos de las membranas causa alteraciones en los transportadores de glutamato y de glucosa así como de las proteínas de unión a GTP, este desbalance en la homeostasis celular hace más vulnerables a las neuronas al daño excitotóxico (Mattson, 2004).

Por otro lado se ha demostrado que existen alteraciones en el metabolismo energético de pacientes con la EA. Se ha reportado un decremento importante en la actividad de la citocromo c oxidasa, piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato (Blass, 2001).

9. Alteraciones en la homeostasis de calcio

Hoy en día es bien conocido que el ión de calcio desempeña un papel muy importante en los procesos de aprendizaje y memoria, así como en la supervivencia y muerte de las neuronas. Un aspecto de la patogénesis de la EA, que parece estar íntimamente involucrado en la disfunción y muerte de las neuronas es la incapacidad, por parte de estas, de regular la homeostasis de calcio (Gabuzda et al., 1994). El péptido A β puede alterar la homeostasis de calcio por medio de la inducción de estrés oxidativo, el cual, altera el funcionamiento de las bombas de calcio localizadas en la superficie de la membrana de las neuronas, lo cual tiene como resultado un aumento en el influjo de calcio a través de canales dependientes de voltaje y receptores ionotrópicos de glutamato (Mattson, 2004), otras investigaciones sugieren que A β promueve el influjo de calcio a través de la formación de poros en la membrana o por medio de la activación de receptores de la superficie celular (Le et al., 2001; Mattson y Chan, 2003).

10. Acercamientos terapéuticos

La producción de especies neurotóxicas de A β a partir del procesamiento de APP parece ser un evento muy importante en la patología de la EA, por este motivo existe gran interés en desarrollar medicamentos para bloquear la actividad de la β y la γ secretasas. Se han desarrollado varios inhibidores específicos de la γ -secretasa los cuales reducen la producción de A β (Dewachter y Van Leuven, 2002), pero su uso en humanos puede ser limitado debido a que la γ secretasa tiene otros sustratos, uno de ellos es Notch, el cual está involucrado en mecanismos de señalización nuclear, por otro lado, los inhibidores de la β secretasa pueden reducir la producción de A β , sin efectos secundarios de consideración (John et al., 2003). Otro intento para reducir la acumulación de A β en el cerebro es el tratamiento con queladores de cobre y hierro (Ritchie et al. 2003; Bush et al., 2003).

Otro acercamiento terapéutico utilizado para la prevención y el tratamiento de la EA es la estimulación del sistema inmune para remover a A β del cerebro. En un inicio, se reportó que la inmunización con A β_{1-42} así como la inmunización pasiva con anticuerpos anti-A β , producía una disminución significativa en el número de placas en cerebros de ratones transgénicos con mutaciones en APP (Schenk et al., 1999; McLaurin et al., 2002). Posteriormente se reportó que este tipo de terapias pueden reducir considerablemente los déficits en la memoria de los ratones (Morgan et al., 2000; Kotilinek et al., 2002). A pesar de la evidente efectividad de la inmunización contra A β , se han observado reacciones adversas en algunos pacientes, por lo que los métodos de inmunización utilizados deben de ser modificados (Hock et al., 2003).

Recientemente, la tecnología de phage display o despliegue en fagos, ha sido utilizada como herramienta terapéutica para la construcción de bibliotecas inmunes de fragmentos variables de cadena sencilla de inmunoglobulina (scFv) (Manoutcharian et al., 2003; Manoutcharian., 2004), así como la generación de anticuerpos anti-A β ₁₋₄₂ (Frenkel et al., 2004; Solomon, 2005), ambos enfoques tienen como objetivo prever la formación de agregados de A β así como la disolución de los depósitos en el cerebro. Otro uso importante que se le ha dado a la técnica de phage display es la de identificar proteínas que se unan específicamente a A β , esto con la finalidad de dirigir agentes que prevengan la formación de placas; dichos agentes también pueden ser utilizados como herramientas de diagnóstico permitiendo la cuantificación de placas en pacientes con la EA (Kang et al., 2003; Wiesehan et al., 2003), este tipo de péptidos representan nuevas moléculas acarreadoras de fármacos en pacientes con la enfermedad así como para la visualización de las placas en el cerebro.

11. Phage display.

La búsqueda e identificación de moléculas de interés biológico ha tenido un avance notable desde la aparición de la tecnología conocida como Phage Display.

El método de expresar péptidos en fagos fue descrito inicialmente por Smith en 1985 y desde entonces ha sido utilizada en diversos estudios. La expresión de diferentes tipos de bibliotecas ha sido utilizada para el estudio de interacciones de distinta naturaleza como son las antígeno-anticuerpo (Scott y Smith, 1990), proteína-proteína (Lowman et al., 1991), ligando-receptor (Lowman y Wells, 1993), DNA-proteína (Choo y Klung, 1994) y sustrato-enzima (Soumillion et al., 1994).

La técnica de Phage Display consiste en la expresión de péptidos o proteínas, fusionadas a algunas de las proteínas de la cubierta de fagos filamentosos (Ff) mientras que el DNA del fago contiene el gen que codifica para esta proteína o péptido (Scott y Smith 1990). Dicha fusión aunada a la relativa sencillez de manipulación *in vitro* e *in vivo* de los fagos, permite la generación de moléculas ligando con altas afinidades de unión desplegadas en los fagos en relativamente poco tiempo (2 o 3 semanas). El Ff más usado es el M13, pero se han utilizado otros fagos, como lo es el fago λ .

En general, los fagos filamentosos miden aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 930 nm de longitud y el 87% de la masa total de la partícula de fago es proteína. El genoma está constituido por una molécula de DNA de cadena sencilla covalentemente cerrada de aproximadamente 6,400 nucleótidos. El DNA se encuentra empaquetado en un cilindro proteico del cual se pueden identificar varios tipos de proteínas. La proteína pVIII (pVIII) es la principal proteína de la cápside con 2,700 copias por partícula de fago, las proteínas VII y IX (pVII y pIX) con cinco copias en uno de los extremos del fago y por último las proteínas III y IV (pIII y pIV) con 4 o 5 copias en el otro extremo del fago (Figura 4). Todas las proteínas de cubierta del fago filamentosos pueden ser fusionadas a péptidos o proteínas ajenas al fago. Generalmente, para la expresión de estas moléculas se recurre, ya sea a la proteína III, o bien a la proteína VIII (Bhardwaj et al., 1995). Por lo regular, la expresión de los péptidos o proteínas en los fagos, se lleva a cabo como fusiones N-terminal en las proteínas de la cubierta del fago.

Debido a que el DNA puede ser clonado en el gen codificante de alguna proteína de la cubierta en el genoma del fago, pueden existir problemas técnicos; así, la infectividad del fago puede verse afectada si grandes insertos están presentes en todas las copias de pIII, o inestabilidad del fago si grandes proteínas son expresadas en pVIII, para evitar esto, se utilizan fagémidos producen fagos híbridos (Barbas et al., 2001).

Estos fagos expresan sobre su superficie proteínas silvestres y proteínas fusionadas (hasta una proteína en pIII y 10-30 % de las proteínas de pVIII). Los fagos híbridos pueden ser también obtenidos al usar genomas de fagos modificados que contengan dos copias del gen codificante de la proteína de cubierta, uno proporcionando la proteína silvestre y el otro la proteína recombinante (Smith y Petrenko, 1997).

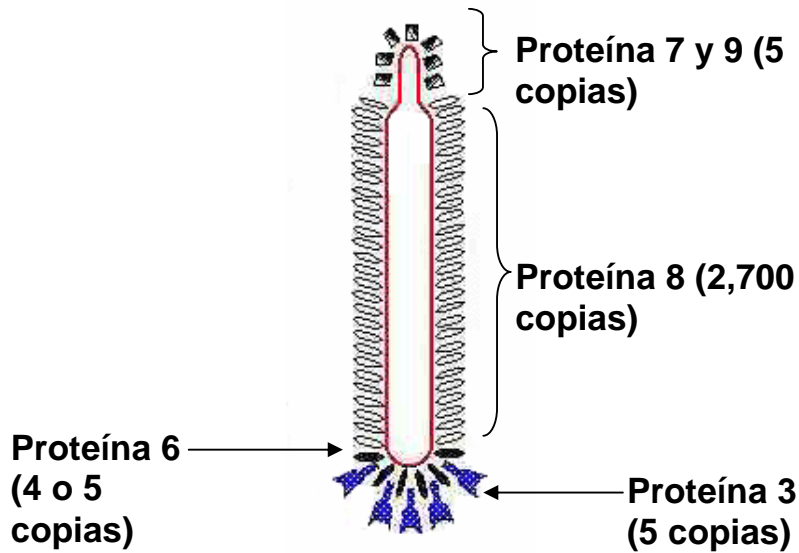


Figura 4. Estructura de fago filamentosos con sus principales proteínas de la cápside

El ciclo de replicación del fago comienza cuando el virus infecta a bacterias *E. coli*. La infección se lleva a cabo por medio del reconocimiento del *pili* de las células macho (F^+) mediante el dominio N-terminal de la proteína pIII. Después de la retracción del *pili* y la penetración del genoma viral a través de la membrana bacteriana, la bacteria se encarga de replicar y traducir su genoma así como el del fago. El ensamblaje de los fagos toma lugar en la membrana citoplasmática con ayuda de las proteínas pI y pIV.

Durante el proceso de infección de los Ff, a diferencia de los fagos líticos, no lisan a sus hospederos. Esto representa una gran ventaja, ya que facilita los procesos de obtención y purificación de las partículas virales. Se sabe que hay una generación de cerca de 1000 partículas de fago producidas durante la primera generación después de la infección y cerca de 100 a 300 fagos son producidos durante cada una de las siguientes generaciones. Este proceso se repite durante varias generaciones, resultando en títulos de 10^{11} hasta 10^{13} fagos por ml de medio de cultivo (Russel, 1994).

Un punto clave de esta metodología es la bioselección o biopanning, durante la cual se prueba la afinidad de unión de los fagos hacia moléculas blanco, por lo general, este proceso es realizado de tres a cuatro veces (rondas) para asegurar y mejorar la especificidad de las clonas de los fagos seleccionados desde la primera ronda y así, enriquecer la población de fagos específicos.

11.1 Tipos de bibliotecas obtenidas por phage display

11.1.1 Bibliotecas de péptidos

En este tipo de bibliotecas se incluyen a un gran número de péptidos cuyas secuencias han sido generadas al azar; la clonación de estos se realiza por medio de oligonucleótidos sintéticos con codones inespecíficos con el fin de variar los residuos de aminoácidos en cada posición (Smith, 1993). Los péptidos se encuentran fusionados a la región N-terminal de cualquiera de las proteínas de la cápside. Generalmente el tamaño de los péptidos es pequeño y puede ir desde 6 hasta 38 aminoácidos.

La estructura de los péptidos desplegados en la superficie de los fagos es lineal, pero también existen aquellos con estructuras secundarias. Este tipo de bibliotecas sirven para la identificación de epitopos/mimotopos reconocidos por anticuerpos o para la identificación de secuencias lineales mínimas que se unan a otras moléculas blanco como receptores de superficie celular, receptores citosólicos, proteínas intra y extracelulares, DNA, etc.

Las bibliotecas de péptidos han surgido recientemente como una estrategia alternativa de investigación con numerosas aplicaciones, incluyendo el mapeo de epitopos lineales o conformacionales (Zhang et al., 1997; Gevorkian et al., 1998; Manoutcharian et al., 1999; Cortese et al., 1996; Germaschewsk y Murray, 1996; Iñiguez et al., 1998; Ferrer y Harrison, 1999; Dybwad et al 1995), incluso de origen no peptídico, con capacidad de generar anticuerpos neutralizantes (Dybwad et al 1995) para el desarrollo de métodos de diagnóstico y de vacunas (Delmastro et al., 1997; Balass et al., 1993).

11.1.2 Bibliotecas genómicas y de ADNc

Consisten en la clonación y expresión de fragmentos de DNA tanto genómico como de ADNc que codifiquen para proteínas completas o solo ciertos dominios de estas (Djojonegoro et al., 1994). En la mayoría de los casos, estas proteínas o sus dominios mantienen su actividad de unión normal. La expresión de DNA genómico derivado de patógenos ha llegado a ser una fuente importante para la identificación de genes codificantes para proteínas u otros dominios implicados en patogénesis e interacciones huésped-hospedero y para aislar antígenos con propiedades diagnósticas o de vacuna. Las bibliotecas de DNA genómico fueron exitosamente usadas para aislar dominios/proteínas de ligandos receptores procarióticos (Palzkill et al., 1996; Jonsson et al., 2004; Williams et al., 2002) así como para identificar antígenos de organismos mas complejos como *Saccharomyces cerevisiae* (Hartvedt et al., 2003) y *Toxoplasma gondii* (Robben et al 2003).

Debido a que las proteínas median esencialmente todos los procesos biológicos a través de interacciones con otras proteínas o moléculas no proteicas, la identificación de los genes codificantes para estas moléculas de bibliotecas que expresen ADNc es un importante paso al entendimiento de los mecanismos implicados en la patogénesis de muchas enfermedades. Con las bibliotecas que expresan ADNc en fagos se han expresado dominios funcionales de proteínas como enzimas, hormonas y moléculas de unión a DNA, RNA u otro ligando (Manoutcharian et al., 2001; Rhyner et al., 2002; Benhar 2001). La mayoría de estos sistemas fusionan directamente los polipéptidos a la región N-terminal de las proteínas pIII y pVIII de la cubierta del fago.

11.1.3 Bibliotecas de anticuerpos

Se producen a través de la clonación de fragmentos de genes de inmunoglobulinas (Ig) en algún vector de expresión de fagos filamentosos. Durante la pasada década, han sido construidas bibliotecas que expresaban fragmentos de anticuerpos (Fab y scFv) usando diversos vectores de expresión en fagos y fagémidos, la amplificación por PCR y la clonación de genes de Ig (Manoutcharian, 2001; Bacsai et al., 2002).

Existen tres principales tipos de bibliotecas de anticuerpos: las inmunes, las no inmunes y las sintéticas, dependiendo de la fuente de los genes de Ig de región variable (VH y VL) usadas para la construcción de las bibliotecas. Con la aplicación de las bibliotecas de anticuerpos se pueden identificar sitios específicos de unión para terapia y diagnóstico en humanos, receptores agonistas y antagonistas e inhibición de enzimas, así como marcadores específicos de células y tejidos (Smothers et al., 2002).

La incorporación del Phage Display hacia las aplicaciones funcionales de la proteómica y la genómica seguramente resultara en nuevos conceptos y estrategias en el campo de la investigación biomédica y la biotecnología farmacéutica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar proteínas que reconocen específicamente $A\beta_{1-42}$ a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer expresada en superficie de fago filamentoso M13.

Objetivos particulares

- i) Clonación de la biblioteca de ADNc de paciente con la enfermedad de Alzheimer en un vector de M13 para su expresión en baja copia en superficie de fago filamentoso.
- ii) Selección de fagos filamentosos que reconocen específicamente al péptido $A\beta$ mediante bioselección con el uso del péptido $A\beta$ normal y biotinilado.
- iii) Caracterización de las clonas seleccionadas mediante secuenciación de DNA de los insertos, deducción de secuencias de aminoácidos y búsqueda en bases de datos electrónicos.

MATERIAL Y METODOS

- **Construcción de la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer**

Para expresar la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente (sexo masculino, 60 años de edad) con la enfermedad de Alzheimer (T7Select, Novagen, Germany) en superficie de fago filamentoso M13 se diseñaron primers en base de la secuencia de DNA del vector T7, para la adición de los sitios de restricción Sfi I (5SFT7: TCATATGCTCGGCCAGCCGGCCATGCTCGGGGATCCGAATTC) y Not I (3BT7: AATCTTAGTCTAGATCTTTACTCGAGTGCGGCCGCAAGCTT) y amplificación del ADNc por medio de PCR en un termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad) (94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min; 70 °C, 1.5 min; por 30 ciclos). Aproximadamente 2 µg de los productos de PCR fueron purificados por medio de kit (Concert Rapid PCR purification System. Life Technologies). Una vez añadidos los sitios de restricción, el DNA fue digerido con las enzimas Sfi I y Not I (New England Bio Labs) y purificado por medio de columna. Posteriormente, el DNA digerido se ligó con 1µg del DNA del vector fagémido pCANTAB 5 E (Amersham Biosciences) digerido con las mismas enzimas, usando T4 ligasa, para su expresión en la proteína 3 (p3) del fago M13. Una vez realizada la ligación de DNA del vector con los ADNc's, se purificó con columna.

Se realizaron 29 electroporaciones, con 1 μL de la construcción para cada transformación, en 45 μL de células electrocompetentes de *E. coli* TG1 (preparadas mediante el protocolo modificado de Sambrook y Russell, 2001) utilizando Gene Pulser II System (Bio-Rad Laboratorios Inc., USA) (2.5 μF y 2.5 volts). Se utilizó 1 ml de medio 2X YT por cada 2 reacciones de electroporación y se juntaron en un matraz de 250 ml para su rescate. Dicho medio se creció durante 2 hrs a 37 °C en agitación (250 rpm) con carbenicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

De este cultivo se tomaron 700 μL y se colocaron en un tubo eppendorf al cual se le agregaron 300 μL de glicerol estéril para su posterior almacenamiento a -70 °C. La complejidad de la biblioteca se determinó mediante el conteo de colonias en cajas LB-Amp.

Posteriormente se tomaron otros 2 ml de cultivo y se llevaron a 10 ml de medio 2X YT más 12 μL de carbenicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), se dejó crecer durante 2 hrs a 37 °C en agitación (250 rpm). Transcurrido este tiempo se agregaron 10 μL de fago helper M13KO7 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por cada ml de medio, se dejó incubar a 37 °C durante 30 min sin agitación y posteriormente a 37 °C con agitación. El siguiente paso fue llevar a un volumen de 40 ml de medio 2X YT con 40 μL de carbenicilina y kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Este cultivo se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C y 250 rpm.

Al siguiente día, este cultivo se distribuyó en dos tubos de policarbonato los cuales se centrifugaron a 8, 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se paso a 2 tubos nuevos, añadiendo una 1/5 parte de PEG/NaCl (20% (w/v) polietilenglicol-8000, 2.5 M NaCl) y se dejo 2 hrs a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 8, 000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se desecho el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de TBS (50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 NaCl), el resuspendido se pasó a tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 14, 000 rpm. El sobrenadante se paso a tubos limpios y se agregó la 1/5 parte de PEG/NaCl, los cuales se dejaron durante 1 hr a 4 °C. Después de transcurrido este tiempo se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 5 min, se desecho el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 400 µL de TBS.

- **Selección de clonas positivas contra el péptido A β ₁₋₄₂ biotinilado por medio de la técnica de bioselección.**

Para el ensayo de bioselección se preincubaron los fagos (10^{13} fagos/ml) con A β ₁₋₄₂ en forma biotinilada (2 µg/pozo) y PBS-BSA 0.1% a 4°C durante toda la noche. Posteriormente el preincubado se depositó en placas Strepra well con estreptavidina (Boehringer Mannheim, Germany) en un volumen de 100 µL/pozo, una vez realizado esto, se incubó la placa 15 min a 37°C y posteriormente 2 hrs a temperatura ambiente.

Se lavó la placa 10 veces con PBS-Tween 0.2% y los fagos que quedaron adheridos a la placa fueron eluidos con 100 μ L de glicina-HCl (0.2 M, pH 2.2) en cada pozo. El eluido fue colectado y neutralizado con Tris-HCl (1 M, pH 9.1). Los fagos eluidos fueron sembrados en placas LB-Amp. Se seleccionaron 12 colonias individuales en la segunda ronda de bioselección, las cuales fueron rescatadas/amplificadas utilizando fago helper M13KO7 y sometidas a tamizaje por ELISA.

- **Tamizaje por ELISA de las clonas obtenidas en la segunda ronda de bioselección.**

Para determinar las clonas que estaban uniéndose a $A\beta_{1-42}$ se utilizó el ensayo de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Asssay), con el péptido pegado a la placa de ELISA, la cual se sensibilizo con el péptido $A\beta_{1-42}$ (0.2 μ g/pozo) y el péptido PAF-3 (Peroxisome assembly factor 3, péptido no relacionado: 0.5 μ g/pozo) y se dejó incubando toda la noche a 4 °C.

Al siguiente día la placa se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.2% y se bloqueó con 200 μ L PBS-BSA 2% durante 1 hr a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween 0.2%.

Los fagos fueron diluidos en PBS-BSA 1% Tween 0.01% para obtener una concentración final de 10^9 fagos por μL (10^{11} fagos/pozo). Los fagos fueron agregados en los pozos correspondientes y se dejó incubar durante 4 hrs a 4°C . Como control positivo se utilizó suero anti-A β de ratón en una dilución 1:4000 y como control negativo al fago M13 silvestre (10^9 fagos/ml). Después de esto la placa se lavó nuevamente con PBS-Tween 0.2%.

Para revelar, se utilizó Anti-IgG de ratón (Dil: 1:500) para los pozos que contenía el suero Anti-A β de ratón, para los pozos que contenían los fagos se utilizó un conjugado monoclonal HRP/anti-M13 (Dilución 1:3000). Se dejó incubar durante 1 hr a 37°C para posteriormente lavar 4 veces con PBS-Tween 0.2%. Por ultimo, se agregaron 100 μL /pozo de ABTS (Zymed) y se leyó en intervalos de 10 min en un lector de placas de ELISA (DYNEX Technologies) a una longitud de onda de 405 nm.

- **Secuenciación del DNA de las clonas positivas.**

El DNA de las clonas positivas en el ensayo de tamizaje por ELISA fueron purificados por medio de mini-prep (Qiagen) y se secuenciaron utilizando ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) y primers para el vector fagémido pCANTAB 5E.

El DNA y las secuencias de aminoácidos se analizaron por medio de búsquedas en la base de datos ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/>) y BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>).

- **Mapeo de reactividad de la clona positiva obtenida en la segunda ronda de bioselección contra el péptido A β .**

Para determinar la región específica de unión de la clona con el péptido A β , se diseñó un formato de ELISA en el cual los pozos de la placa fueron sensibilizados con varios fragmentos del péptido: A β ₁₋₄₂, A β ₁₋₁₆, A β ₁₂₋₂₈, A β ₁₇₋₄₂, A β ₂₅₋₃₅ (0.2 μ g/pozo), y PAF-3 (0.5 μ g/pozo) como péptido no relacionado. La placa se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.2% y se bloqueó con 200 μ L PBS-BSA 2% durante 1 hr a 37°C. Nuevamente se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.2%.

Los fagos fueron diluidos en PBS-BSA 1% Tween 0.01% para obtener una concentración final de 10⁹ fagos por μ L (10¹¹ fagos/pozo). Los fagos fueron agregados en los pozos correspondientes y se dejó incubar durante 4 hrs a 4 °C.

Como control positivo de fago se utilizó la clona b4.4 (10^9 fagos/ml), la cual fue obtenida a partir de una biblioteca no inmune de humano de fragmentos variables de cadena sencilla de inmunoglobulina (scFv) y que reconoce un epítipo dentro de los primeros 28 aminoácidos de A β ₁₋₄₂ (Manoutcharian et al., 2004). Como control negativo se utilizó el fago M13 silvestre (10^9 fagos/ml). Después de esto se lavó la placa con PBS-Tween 0.2%.

Para revelar la placa se utilizó un conjugado monoclonal HRP/anti-M13 (Dilución 1:3000). Se dejó incubar durante 1 hr a 37°C para posteriormente lavar 4 veces con PBS-Tween 0.2%. Por ultimo, se agregaron 100 μ L/pozo de ABTS (Zymed) y se leyó en intervalos de 10 min en un lector de placas de ELISA (DYNEX Technologies) a una longitud de onda de 405 nm.

- **ELISA de competencia**

Para el ELISA de competencia se sensibilizó la placa con el péptido no relacionado PAF-3 y A β ₁₋₄₂ y se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Posteriormente se prepararon los péptidos competidores a tres concentraciones distintas (0.4, 0.8 y 1.6 μ g/pozo) diluidos en PBS-BSA 1% Tween 0.1%. Dichos péptidos se dejaron incubar toda la noche a 4°C en agitación con la clona reactiva al péptido A β (concentración final de 10^8 fagos por μ L). Al siguiente día se lavó la placa 4 veces con PBS-BSA 0.2% y se bloqueó con 200 μ L/pozo de PBS-BSA 2% durante 1 hr a 37 °C.

Posteriormente se agregaron los péptidos competidores con el fago en los pozos correspondientes y se dejó incubar durante 4 hrs a 4 °C. Transcurrido este tiempo se dejó la placa 30 min a temperatura ambiente para posteriormente lavarla 4 veces con PBS-Tween 0.2%. Para revelar, se utilizó la misma metodología descrita anteriormente.

- **Clonación del inserto proveniente de la clona MAPJ en el vector pGEX-4T-1**

Para la clonación del inserto proveniente de la clona MAPJ en el vector pGEX-4T-1 se diseñaron primers para la adición de los sitios de restricción Sma I (MAPJ1.5: GATTCTCCCGGGTAGCGTAAAAACAGAGACCAAA) y Xho I (MAPJ2.3: AGAATAGACTCGAGTGAAAGCTTCTTAATTTCTTTT) y amplificación del fragmento de DNA por medio de PCR (94 °C, 1 min; 62 °C, 1 min; 70 °C, 1 min por 30 ciclos). La digestión de los DNAs y del vector, así como su ligación se realizaron como se menciona arriba.

- **Inmunolocalización de A β ₁₋₄₂ y MAP1B**

Para este experimento, previamente se diferenciaron células de neuroblastoma SH-SY5Y con ácido retinoico, para obtener neuronas diferenciadas y determinar la localización intracelular de A β ₁₋₄₂ y MAP1B. Las células fueron pre-incubadas con A β ₁₋₄₂ a una concentración de 200 nM.

Las neuronas fueron lavadas en PBS 1X a 37 °C para remover cualquier rastro de medio de cultivo. Posteriormente las muestras fueron fijadas con formaldehído tibio (37 °C) al 3.7 % y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagaron las células 4 veces con PBS.

Las células fueron permeabilizadas en TRITON X-100 al 0.1% durante 15 minutos. De nuevo se lavaron 4 veces las células con PBS. Se aplicaron 4 gotas (200 μ L aproximadamente) del potenciador de señal Image-iT™Fx. Se dejó incubando durante 30 min a temperatura ambiente y en humedad. Posteriormente se lavó nuevamente con PBS 1X.

Se dejaron incubando las células con el anticuerpo primario diluido 1:100 con PBS (MAP1B anti-ratón y A β ₁₋₄₂ anti-conejo) durante toda la noche. Al siguiente día, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X. A continuación, se incubaron las neuronas con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 488 anti-ratón y Alexa Fluor® 555 anti-conejo) diluido 1:500 por 4 hrs. Nuevamente las muestras fueron lavadas con PBS.

Una vez realizados los pasos anteriores, se procedió a montar las muestras en portaobjetos para su análisis en el microscopio de fluorescencia (Olympus IX70).

RESULTADOS

Construcción de la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer expresada en fago filamentoso M13.

La preparación de la biblioteca de ADNc de cerebro de un paciente con la enfermedad de Alzheimer expresada en la superficie de fagos filamentosos involucró 3 etapas:

1. Preparación de los insertos de ADNc a partir de la biblioteca de ADNc, por medio de reacciones de PCR.
2. Clonación de estos insertos en el vector de expresión fagémido pCANTAB 5 E, en donde se utilizaron los sitios de restricción Sfi I y Not I
3. Expresión de la biblioteca en la superficie de partículas virales de fago M13, el cual es capaz de infectar células de *E. coli* TG1.

Se calculó una diversidad de 3.1×10^5 fagos recombinantes para la biblioteca de ADNc expresada en fago filamentoso M13.

Bioselección de la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer.

Para identificar clonas reactivas al péptido A β_{1-42} en la biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer, se realizaron 2 rondas de bioselección con el péptido A β_{1-42} en forma biotilada (en solución), (Tabla 2).

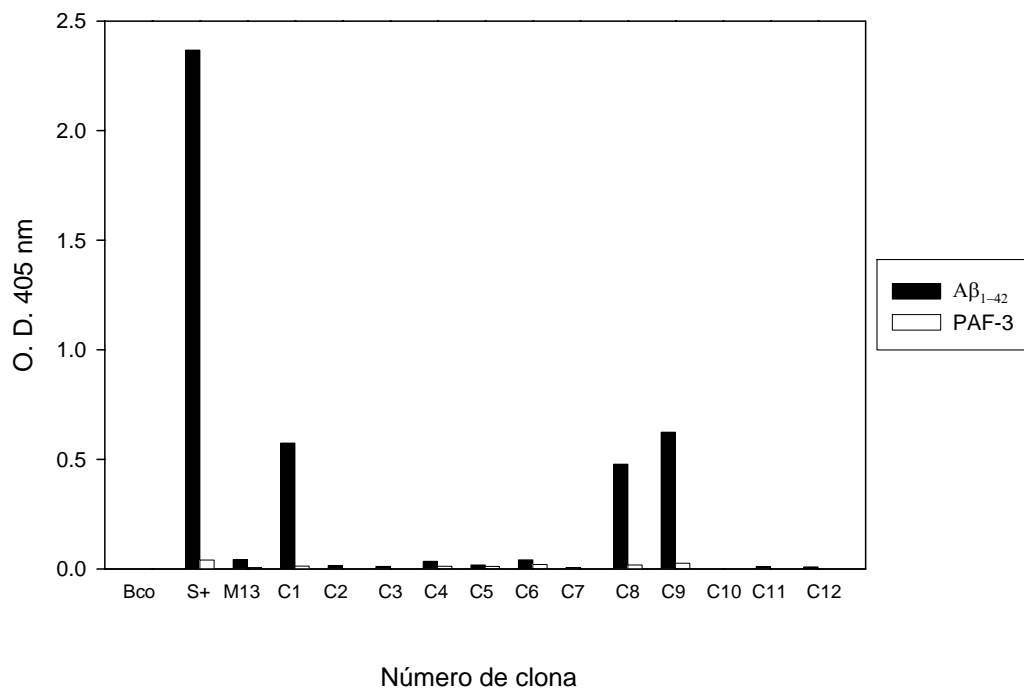
Tabla 2. Título de los fagos eluidos en cada una de las rondas de bioselección. En titulo de entrada corresponde al titulo utilizado para la bioselección y el titulo de salida corresponde al titulo obtenido en cada ronda de bioselección.

Ronda de bioselección	Fagos de entrada	Fagos de salida
1	5.3×10^{13}	5×10^4
2	4.9×10^{13}	3.4×10^5

Se seleccionaron al azar 12 clonas de la segunda ronda de bioselección, las cuales fueron rescatadas/amplificadas utilizando fago helper M13KO7 y se probó su reactividad al péptido A β_{1-42} de estas mediante un ensayo de tamizaje por ELISA.

Tamizaje por ELISA de los fagos eluidos de la segunda ronda de bioselección.

Por medio del tamizaje por ELISA se identificaron a aquellas clonas reactivas al péptido $A\beta_{1-42}$ a partir de las clonas obtenidas en la segunda ronda de bioselección (Gráfica 1). Todas la clonas fueron diluidas para obtener una concentración final de 10^9 fagos/ μ L. Como control positivo se utilizó un suero anti- $A\beta$ de ratón en una dilución 1:4000 y como control negativo al fago M13 silvestre a una concentración de 10^9 / μ L.



Gráfica 1. Tamizaje por ELISA con el péptido $A\beta_{1-42}$ y PAF-3 (peroxisome assembly factor 3, péptido no relacionado) ambos fijos en la placa y las 12 clonas provenientes de la segunda ronda de bioselección. Blanco (Bco), suero anti- $A\beta$ de ratón (S+), M13 (fago silvestre).

Se seleccionaron como positivas las clonas 1 (C1), 8 (C8) y 9 (C9), todas ellas provenientes de la segunda ronda de bioselección. Se realizó un análisis de PCR de las tres clonas positivas para comprobar que la reactividad de las éstas hacia $A\beta_{1-42}$ se debiera a la expresión del inserto en el fago. Las tres clonas presentaron insertos de 600 pb (Figura 5).

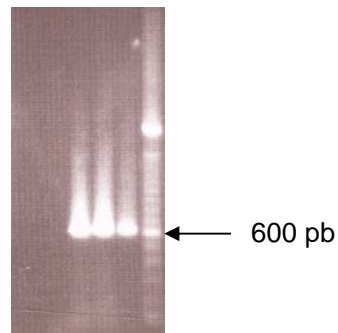


Figura 5. Análisis de PCR de las clonas positivas provenientes de la segunda ronda de bioselección. Gel de TBE-agarosa al 0.8% con tinción de bromuro de etidio y visualizado en luz UV.

Secuenciación de las clonas reactivas

Se analizaron las secuencias de nucleótidos de las tres clonas reactivas (C1, C8 y C9) a $A\beta_{1-42}$. La secuencia de aminoácidos se dedujo a partir de la secuencia de nucleótidos de cada una de las clonas (Tabla 3). Al realizar un alineamiento de las secuencias de las tres clonas, con el programa de computo DNASTAR, se encontró que dichas secuencias eran idénticas en un 100%.

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de las clonas C1, C8 y C9 obtenidas en la segunda ronda de bioselección.

Clona	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
C1, C8 y C9	ATGCTCGGGGATCGAATTCAA	
	GCGTAAAAACAGAGACCAAAC	
	CTTCAGTGA CTGAAAAGGAG	
	GTTCCCAGCAAAGAAGAGCCA	
	TCTCCAGTGAAAGCCGAGGT	
	GGCTGAGAAGCAAGCCACAG	VKTETKPSVTEKEVPSKEEPSVKAE
	ATGTCAAACCCAAAGCTGCCA	VAEKQATDVKPKAAKEKTVKKETKV
	AGGAGAAGACGGTGAAAAAG	KPEDKKEEKEKPKKEVAKKEDKTIK
	GAAACAAAGGTAAAGCCTGAA	KEEKPKKEEVKKEVKKEIKKEEKKEP
	GACAAGAAAGAGGAGAAAGA	KKEVKKETPPKEVKKEVKKEEKKEVK
	AAAGCCAAAGAAAGAAGTGG	KEEKEPKKEIKKL
	CTAAAAAGGAGGACAAAACAC	
	CTATCAAGAAGGAGGAAAAAC	
	CAAAAAAGGAAGAGGTGAAA	
	AAAGAAGTCAAAAAAGAGATC	
	AAGAAAGAAGAGAAAAAAGAA	
	CCCAAGAAAGAGGTTAAGAAA	
	GAAACACCGCCAAAGGAAGTC	
	AAGAAGGAAGTTAAGAAGGA	
	AGAGAAGAAGGAAGTGAAAA	
AGGAAGAAAAGGAACCCAAAA		
AAGAAATTAAGAAGCTTT		

Se realizó un análisis tanto de las secuencias de nucleótidos como de los aminoácidos en bases de datos como ExPASy y BLAST. El resultado de la búsqueda fue que la secuencia de las clonas positivas corresponde a la proteína de asociación a microtúbulos MAP1B. Como las tres clonas resultaron ser la misma, se decidió nombrarla MAPJ.

Posteriormente se realizó un alineamiento de la secuencia original de MAP1B con la secuencia de la clona MAPJ y se observó que existe un 100% de homología entre ambas (Figura 6).

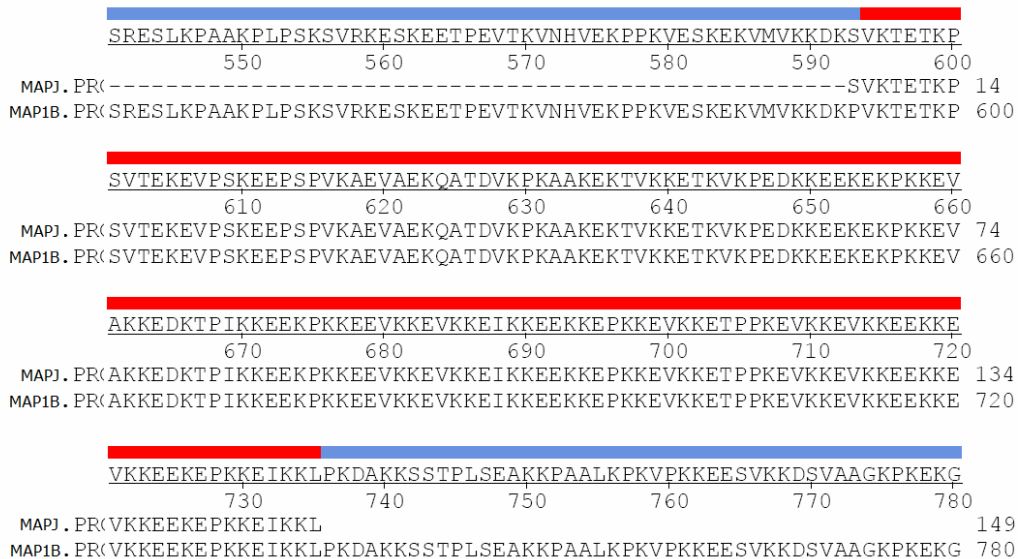


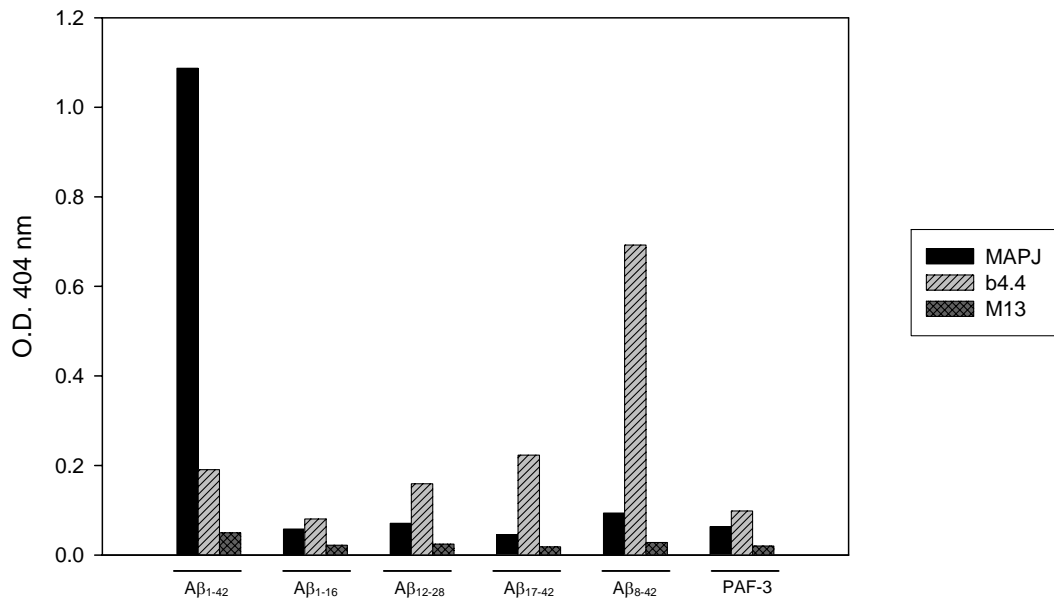
Figura 6. Alineación de la clona positiva MAPJ y MAP1B. El color rojo representa el 100% de coincidencia entre las dos secuencias de aminoácidos. DNASTAR, Clustal method.

Al analizar mas detalladamente la secuencia de la clona MAPJ en bases de datos electrónicos (www.expasy.ch/sprot/ y www.hprd.org), se encontró que dicha secuencia corresponde al sitio de interacción de la proteína MAP1B con los microtúbulos. Los resultados anteriores sugieren un nuevo tipo de interacción A β -proteína en neuronas de pacientes con la EA. (Tabla 4).

Tabla 4. Correspondencia entre las secuencias del dominio de unión a microtúbulos de la proteína MAP1B de humano y la secuencia de la clona MAPJ obtenida en la segunda ronda de bioselección. Los aminoácidos subrayados y en rojo corresponden a aquellos que son idénticos entre ambas secuencias.

Dominio de unión a microtúbulos de la proteína MAP1B de humano (Swiss-Prot entry: P46821)	Secuencia de la clona MAPJ
<p> KKDKP<u>VKTETKPSVTEKEVPSKEEPSVKAEV</u> <u>AEQATDVKPKAAKEKTVKKETKVKPEDKKE</u> <u>EKEKPKKEVAKKEDKTPIKKEEKPKKEEVKKE</u> <u>VKKEIKKEEKKEPKKEVKKETPPKEVKKEVKK</u> <u>EEKKEVKKEEKKEPKKEIKKL</u>PKDAKKSSTPLS EAKKPAALKPKVPKKEESVKKDSVAAGKPKE KGKIKVIKKEGK </p>	<p> <u>VKTETKPSVTEKEVPSKEEP</u> <u>SPVKAEVAEKOATDVKPKA</u> <u>AKEKTVKKETKVKPEDKKE</u> <u>EKEKPKKEVAKKEDKTPIK</u> <u>KKEKPKKEEVKKEVKKKEIKK</u> <u>EEKKEPKKEVKKETPPKEVK</u> <u>KEVKKEEKKEVKKKEEKKEPK</u> <u>KEIKKL</u> </p>

Con el objeto de identificar la preferencia de unión de la clona MAPJ con algún fragmento del péptido A β , se diseñó un protocolo de ELISA en el cual se utilizaron varios fragmentos del péptido: 1-42, 1-16, 12-28, 17-42, 8-42. De los datos obtenidos en este experimento, se observó que la clona MAPJ no presentó reactividad con ningún fragmento de A β , a excepción de la forma completa de 42 aminoácidos, lo anterior nos sugiere que posiblemente la clona MAPJ este reconociendo una conformación del péptido A β ₁₋₄₂ en vez de una secuencia lineal. (Gráfica 2).

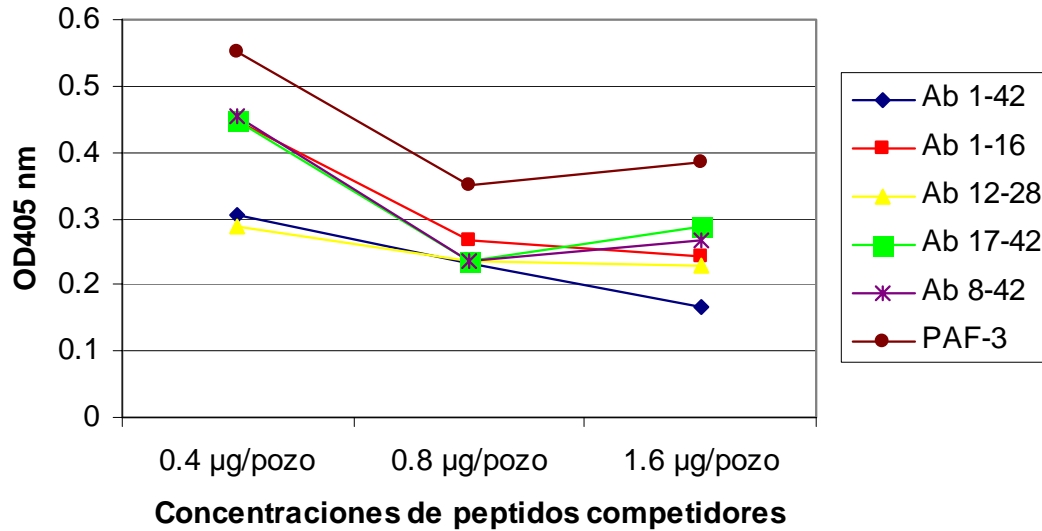


Fragmentos del péptido Aβ

Gráfica 2. Mapeo de la clona MAPJ con los fragmentos del péptido Aβ 1-42, 1-16, 12-28, 17-42, 8-42 y PAF-3 (peroxisome assembly factor 3). Como control positivo de fago se utilizó la clona b4.4 y como control negativo el fago M13 silvestre.

En otro intento por determinar la región del péptido Aβ con la cual esta interactuando la clona MAPJ, se diseñó un protocolo de ELISA de competencia, para observar el efecto en la interacción entre la clona MAPJ y el péptido Aβ en presencia de posibles péptidos competidores (Aβ₁₋₄₂, Aβ₁₋₁₆, Aβ₁₂₋₂₈, Aβ₁₇₋₄₂ y Aβ₈₋₄₂) a tres concentraciones distintas (0.4, 0.8 y 1.6 μg/pozo).

No se observó claramente que algún fragmento estuviera compitiendo por la unión entre MAPJ y Aβ₁₋₄₂, a excepción del mismo Aβ₁₋₄₂. Dichos resultados corroboran la idea anteriormente mencionada de que MAPJ esta reconociendo una conformación adoptada por Aβ en lugar de una secuencia lineal (Gráfica 3).



Grafica 3. ELISA de competencia. La placa fue sensibilizada con el péptido A β ₁₋₄₂. Se utilizaron varios fragmentos del péptido A β como péptidos competidores a tres concentraciones distintas (0.4, 0.8 y 1.6 µg/pozo). Y al péptido PAF-3 como péptido no relacionado.

Hoy en día es bien conocido el hecho de que las formas oligoméricas de A β , desempeñan un papel patógeno en la EA (Tanzi, 2005). Por esta razón se realizó una prueba de ELISA, para determinar una posible interacción entre la clona MAPJ y las oligómeros del péptido. Los resultados de este experimentos demostraron que la clona MAPJ solo interactúa con las formas fibrilares de A β y no con las formas oligoméricas (datos no mostrados).

Lo anterior sugiere, que la acción tóxica de A β en las neuronas, se puede estar llevando a cabo por diferentes estados de agregación del péptido y no solo por formas oligoméricas. En el presente estudio, se encontró que la presencia de A β dentro de las neuronas en forma de fibrillas, es capaz de interactuar con proteínas de asociación a los microtúbulos cuyo resultado puede estar reflejándose en la patogenia de la enfermedad.

Una vez que se comprobó la unión entre la clona MAPJ y $A\beta_{1-42}$, mediante la técnica de ELISA, se procedió a comprobar si tanto la proteína MAP1B como $A\beta_{1-42}$, se localizaban en las mismas regiones de las células neuronales. Para esto se diseñó un protocolo de inmunolocalización.

Se utilizaron anticuerpos primarios anti-MAP1B (ratón) y anti- $A\beta_{1-42}$ (conejo). Para el caso de la proteína MAP1B se utilizó como anticuerpo secundario un anti-ratón, el cual emite una señal de color verde. En cuanto a $A\beta_{1-42}$ el anticuerpo utilizado fue un anti-conejo asociado con un fluoróforo que emite una señal de color rojo (Figura 7).

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran claramente que tanto MAP1B como $A\beta_{1-42}$ tienen la misma localización dentro de las neuronas. Cabe señalar, que esta co-localización en ningún momento sugiere la interacción entre las MAP1B y $A\beta_{1-42}$. No se observaron alteraciones evidentes en la longitud e integridad de los axones por la acción de $A\beta_{1-42}$.

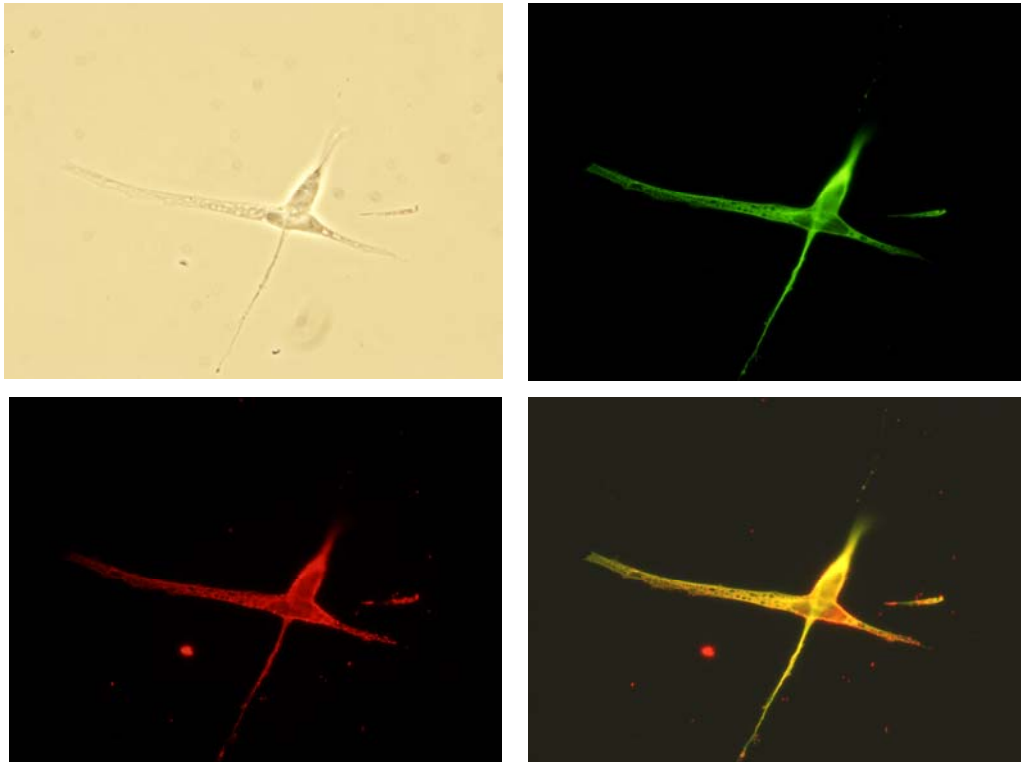


Figura 7. Células neuronales en microscopía de contraste de fases (Olympus IX70) (esquina superior izquierda). Localización de la proteína MAP1B en cuerpo y axones de neuronas (esquina superior derecha). Localización del péptido A β_{1-42} (esquina inferior izquierda). Sobrelapamiento de A β_{1-42} y MAP1B (esquina inferior derecha). Microscopía de fluorescencia (Olympus IX70). Las imágenes fueron procesadas utilizando el software Image- Pro-Plus. Todas las fotografías fueron tomadas con el objetivo 40x.

Un paso importante para corroborar la interacción entre A β_{1-42} y MAP1B es tener el fragmento de MAP1B libre de fago. Para esto, se clonó el inserto presente en el vector fagémido en el vector pGEX-4T-1, el cual es un vector de expresión de proteínas en bacterias. Este sistema permite purificar la proteína debido a esta sale fusionada a GST. Una vez realizada la clonación, la construcción fue transformada mediante electroparación, de la cual se seleccionaron cuatro colonias para comprobar mediante PCR le presencia del inserto en el nuevo vector de expresión (Figura 8). De las cuatro colonias seleccionadas, dos (Carril: 2 y 4) presentaron la construcción deseada. Actualmente este y otros experimentos relacionados se están realizando en el laboratorio del Dr. Karen Manoutcharian y la Dra. Goar Gevorkian.

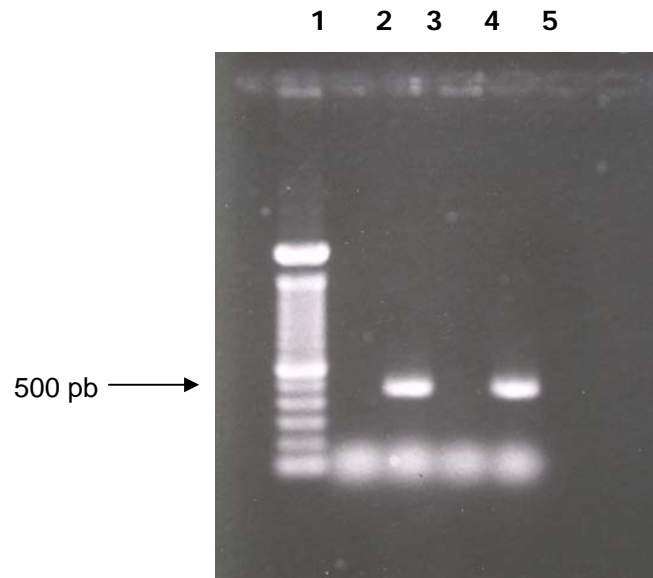


Figura 8. Reacciones de PCR de colonia para comprobar la presencia del inserto proveniente de la clona MAPJ en el vector de expresión pGEX-4T-1. Carril 1: Marcador de 100 pb. Carril 2, 3, 4 y 5 colonias provenientes de la transformación por electroporación. Gel de TBE-agarosa al 0.8% con tinción de bromuro de etidio y visualizado en luz UV.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En el presente estudio se seleccionaron péptidos que se unen al $A\beta_{1-42}$ a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de paciente con la enfermedad de Alzheimer expresada en superficie de fago filamentoso M13.

A partir de las clonas obtenidas en la segunda ronda de bioselección, se identificaron tres clonas que se unen a $A\beta_{1-42}$ según los ensayos de tamizaje por ELISA (Grafica 1). El alineamiento de las tres secuencias de nucleótidos demostró que las tres clonas compartían la misma secuencia por lo que se decidió nombrarla MAPJ.

Al analizar detalladamente las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de MAPJ con las bases de datos electrónicos ExpASY y BLAST se encontró que dicha secuencia corresponde 100 % con la proteína de asociación a microtúbulos MAP1B (Figura 6).

MAP1B pertenece a la familia de proteínas de asociación a microtúbulos (MAP's) de alto peso molecular junto con MAP1A y MAP2. MAP1B, también conocida como MAP5, fue originalmente identificada como una proteína de 320-kD que fue co-purificada con los microtúbulos del tejido cerebral de mamífero (Greene et al., 1983). Esta proteína, es la primera MAP en ser expresada durante el desarrollo del sistema nervioso. Sus niveles de expresión aumentan considerablemente en organismos post-natales (Binder et al., 1984; Tucker 1989) para posteriormente disminuir en los adultos a excepción de aquellas regiones del cerebro que conservan altos niveles de crecimiento axonal y plasticidad sináptica (Schoenfeld et al., 1989; Tucker et al., 1989)

El papel que juega esta proteína es muy importante en la diferenciación de las neuronas, tanto del sistema nervioso central y periférico, debido a que participa en formación de los axones promoviendo el ensamblaje y dinámica de los microtúbulos necesarios para que se lleve a cabo este proceso (Meixner et al., 2000; González-Billault et al., 2001).

MAP1B es una proteína altamente conservada con un 91 % de identidad entre las secuencias de humano y de ratón. Entre las secuencias más conservadas se encuentran las regiones N y C-terminal. Los primeros 550 aminoácidos de MAP1B de humano son 98 % idénticos a los de ratón, mientras que los últimos 250 comparten un 95 % de similitud.

El ARNm de MAP1B es traducido para dar origen a una poliproteína, la cual es procesada proteolíticamente. El resultado de este procesamiento es la producción de una cadena pesada, proveniente de los primeros 2, 200 aminoácidos de la región N-terminal de la poliproteína, y una cadena ligera de 250 aminoácidos, originada de la región C-terminal (Hammarback et al., 1991) (Figura 9).

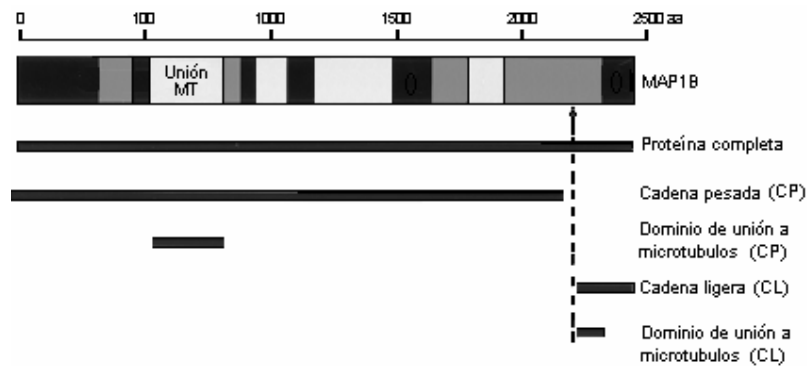


Figura 9. Representación esquemática de los diferentes dominios de MAP1B. La línea en la parte superior representa el número de aminoácidos de la proteína completa así como cada una de las regiones. Las líneas oscuras ubicadas en la parte inferior se ejemplifican cada una de las regiones por las que esta compuesta la poliproteína. Esta es procesada proteolíticamente para dar origen a una cadena pesada (CP) con un dominio de unión a microtúbulos (MT) y una cadena ligera (CL) con otro dominio de unión a MT.

En 1994, cuando se pudo conocer la secuencia completa de MAP1B de humano, se identificaron los dos dominios de unión a microtúbulos presentes en la proteína. El primer dominio fue localizado entre los aminoácidos 524 al 851 (con múltiples copias de motivo KKEE y KKEI/V) mientras que el segundo fue ubicado entre los aminoácidos 2219 al 2338 (Noble et al., 1989; Lien et al., 1994).

Por medio de diversos métodos (Chou y Fasman, 1978 y Garnier et al., 1978), se predijo que la estructura secundaria de ambos dominios de unión presentan varias regiones con α -hélices, los cuales interactúan de manera iónica con las α -hélices de la región C-terminal de las moléculas de tubulina.

La funcionalidad de MAP1B durante el desarrollo neuronal esta regulada por fosforilación (García-Pérez et al., 1998). Existen numerosos sitios fosforilables en esta proteína y, por lo menos, se pueden distinguir dos modos de fosforilación (Ulloa et al., 1993). El modo I se encuentra bajo una fuerte regulación durante el desarrollo y esta presente principalmente en los husos mitóticos de las células precursoras neuronales (Riederer et al., 1993) y en los axones que se encuentran en elongación (Mansfield et al., 1992; Gordon-Weeks et al 1993). El modo I de fosforilación se encuentra ausente en la mayoría de neuronas maduras a excepción de aquellas regiones del cerebro con capacidad regenerativa (Gonzalez-Billault et al., 1993). Las cinasas involucradas en este modo de fosforilación son GSK3 (glycogen synthase kinase-3) y cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) (García-Pérez et al., 1998). Cdk5, es una cinasa que se vital en en la progresión del ciclo celular y se encuentra desregulada en la EA. Esta re-expresión de proteínas reguladas durante el desarrollo, puede estar contribuyendo en la formación de brotes neuríticos aberrantes, característicos de la enfermedad (Arendt, 2001). El modo II, también conocido como modo de fosforilación constitutiva, esta presente en las dendritas y el cuerpo de las neuronas maduras (Ulloa et al., 1994).

En cuanto a su localización en las neuronas, diversos análisis inmunohistoquímicos han revelado que MAP1B se encuentra presente en los axones, cuerpo celular y dendritas de las neuronas y células gliales (Bloom et al., 1985; Riederer et al., 1986) y que es diferencialmente fosforilada en diversos sitios dependiendo de si se encuentra en neuronas o células gliales, su localización subcelular en las neuronas y el estadio de desarrollo (Hirokawa et al., 1985).

Dado que el citoesqueleto juega un papel crítico en la función y la sobrevivencia de las neuronas, varios grupos de investigación han centrado su atención en el papel que juegan las MAP's en el desarrollo del sistema nervioso.

Diversos estudios en ratones transgénicos han demostrado que aquellos que solo tienen una copia funcional del gen MAP1B presentan anomalías en estructuras laminadas del cerebro como la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo, así como una disminución significativa en la magnitud y duración de la potenciación a largo plazo, lo cual apoya la hipótesis de que MAP1B desempeña un papel funcional muy importante en la migración neuronal, axogénesis así como en las alteraciones del citoesqueleto presentes en las dendritas post-sinápticas (Gonzalez-Billault et al., 2000; Meixner et al., 2000; Zervas et al., 2005).

Aunque muchas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por presentar anomalías a nivel de citoesqueleto el papel que desempeñan estos cambios en el desarrollo de la enfermedad no ha sido comprendido del todo. La principal limitante consiste en determinar si estas alteraciones juegan un papel causal en la degeneración neuronal, o si simplemente las neuronas degeneran por otras causas.

En el presente trabajo se identificó que la clona MAPJ se une a $A\beta_{1-42}$ según los ensayos de tamizaje por ELISA. La secuencia del inserto de esta clona que interactúa con $A\beta_{1-42}$ consta de 142 aminoácidos con múltiples copias del motivo KKEE y KKEI/V y comparte el 100 % de similitud con los aminoácidos 593 al 733 de la cadena pesada de MAP1B (humano). Un punto muy interesante, es que según los datos obtenidos por varios investigadores (Noble., et al., 1989; Lien et al., 1994), demuestran que esta región se encuentra dentro de un dominio de unión a microtúbulos (Tabla 4).

La interacción entre $A\beta_{1-42}$ y MAP1B, en esta región en particular, podría estar desempeñando un papel muy importante en la EA, debido a que $A\beta_{1-42}$ puede estar interfiriendo en la unión de MAP1B con la tubulina y por lo tanto alterar la dinámica y estabilidad de los microtúbulos. Esto podría explicar las alteraciones sinápticas encontradas por diversos grupos de investigación (Larson et al., 1999; Walsh et al., 2002a; Cleary et al., 2005; Tanzi, 2005), así como la alteración en la migración de varios organelos en la EA (Ebner et al., 1998; Jiménez-Mateos et al., 2006).

Aunque existen reportes de que MAP1B es un componente de las placas seniles encontradas en la EA (Takahashi et al 1991), este es el primer reporte en el cual se demuestra experimentalmente la interacción entre MAP1B expresado en la superficie del fago filamentososo M13 y $A\beta_{1-42}$, y su posible efecto en la patogénesis de la EA. Para comprobar por otro método si existe la interacción entre el fragmento de MAP1B y $A\beta_{1-42}$, en nuestro laboratorio se está tratando de obtener el fragmento de MAP1B de manera recombinante con el fin de realizar los experimentos correspondientes.

Recientemente Uchida reportó que la proteína completa de MAP1B puede actuar como un efector de la muerte celular en respuesta a la depositación de $A\beta$. Por otro lado, Fife y colaboradores demostraron que las formas oligoméricas de $A\beta$, causan alteraciones en la homeostasis de calcio, cuyo efecto, es la activación de la calpaina la cual se encarga de degradar MAP2 en sus tres isoformas (MAP2a, MAP2b y MAP2c) mientras que MAP1A y MAP1B son degradadas mediante la activación de la caspasa 3 y calpaina, también por la influencia de $A\beta$. También observaron que la pérdida en la estructura de los microtúbulos se lleva a cabo antes de la aparición de las típicas alteraciones morfológicas y bioquímicas características de la apoptosis. Por otro lado, la utilización de diversos agentes farmacológicos que alteran el funcionamiento de los microtúbulos producen algunas de las anomalías observadas en la EA (Michaelis, 2003).

En el mapeo que se hizo de la clona MAPJ con los fragmentos del péptido $A\beta_{1-42}$ se observó esta clona solo era reactiva al péptido de 42 aminoácidos (Grafica 2 y 3), lo cual sugiere que MAPJ esta reconociendo una conformación del péptido en lugar e una secuencia lineal.

Cabe señalar que el péptido $A\beta_{1-42}$ utilizado en el presente trabajo se encontraba en forma fibrilar, por lo que se realizó un ELISA para probar la reactividad de esta clona hacia las formas oligoméricas. Los resultados obtenidos mostraron claramente que MAPJ solo reconoce la forma fibrilar de $A\beta$. Aunque no se ha determinado con claridad el estado de agregación del péptido dentro de las neuronas, no hay que descartar que no solo los oligómeros sino también las fibrillas intraneuronales puedan estar causando un efecto tóxico para las células.

En el ensayo de inmunolocalización que se realizó para determinar ubicación de MAP1B y MAPJ, se observó que MAP1B esta principalmente presente en el cuerpo de las neuronas así como en lo largo de los axones, lo cual coincide con resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación (Bloom et al., 1985; Riederer et al., 1986). En el caso de $A\beta_{1-42}$, su distribución es muy similar a la de MAP1B, la única diferencia es que $A\beta_{1-42}$ no esta tan extensamente distribuido en los axones (Figura 7). Es importante señalar que no se observó ningún tipo de alteración morfológica en los axones. Tal vez eso se debe a que las neuronas fueron incubadas con una concentración muy baja de $A\beta_{1-42}$ (200 nM). Es importante remarcar que, este experimento, en ningún momento trata de ejemplificar algún tipo de interacción entre las proteínas.

Como se mencionó al principio, en los últimos años ha surgido gran interés en determinar el papel que juegan las diversas alteraciones en los microtúbulos en las diversas enfermedades neurodegenerativas. La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se caracteriza por la presencia de acumulaciones anormales de neurofilamentos en las neuronas motoras (Julien y Mushynski, 1998). La agregación de neurofilamentos puede bloquear el transporte vesicular a lo largo de los axones y subsecuentemente causar la degeneración de las neuronas.

En el caso de la enfermedad de Huntington (EH), la huntingtina (htt), una de las proteínas que se cree, es la principal causante de la enfermedad, interactúa con una gran variedad de proteínas citoplasmáticas entre las que destacan la proteína HIP-1 (proteína de asociación a microtúbulos) (Wanker et al., 1997), tubulina (Tukamoto et al., 1997), dinactina (Li et al., 1998), proteínas con dominios WW (proteínas multidominios del citoesqueleto) (Faber et al., 1998) y *Sial* (interviene el ensamblaje del citoesqueleto) (Bailleul et al., 1999).

En el caso de la EA, a partir que se determinó que los niveles de A β correlacionan directamente con la densidad de marañas neurofibrilares (McLean et al., 1999) y que la severidad de la demencia, así como la pérdida neuronal, correlaciona mejor con las marañas neurofibrilares que con los depósitos de A β en etapas tempranas de la EA, se ha puesto especial atención en las modificaciones del citoesqueleto y su efecto en la progresión de la enfermedad. Como la proteína tau, fue la primera en la cual se identificaron alteraciones en su funcionamiento, la atención de los investigadores se ha enfocado en determinar el papel que juega en la enfermedad.

Uno de los descubrimientos que señalaron a tau como uno de los principales participantes en la patogénesis de la EA es que la hiperfosforilación de tau disminuye su capacidad de unión así como su actividad en el ensamblaje de los microtúbulos (Lindwall y Cole, 1984).

Cabe señalar que las neuronas tienen la capacidad de compensar la pérdida de la función de una MAP por otra (Iqbal et al., 2005). Al ser MAP1B uno de los candidatos para compensar la pérdida de la función de tau, su adecuado funcionamiento es de vital importancia para las neuronas, pero como demostró en el presente trabajo, el péptido $A\beta_{1-42}$ se une directamente a uno de los dominios de unión de microtúbulos, lo que estaría agravando, aun más, las alteraciones del citoesqueleto.

En este trabajo se propone que la interacción de $A\beta_{1-42}$ con un dominio de unión a microtúbulos de MAP1B puede estar participando directamente en las alteraciones a nivel de citoesqueleto encontradas en la EA. Como se mencionó anteriormente, es importante determinar si estas alteraciones son causales de la enfermedad o solo representan un evento secundario asociado a la muerte de las neuronas, aun así, estos eventos parecen estar jugando un papel central no solo en la EA si no en otras enfermedades neurodegenerativas. Recientemente, ha surgido el interés de utilizar fármacos estabilizadores de los microtúbulos como el taxol, para tratar de revertir la neurodegeneración en la EA (Michaelis, 2003). Lo que es claro es que, profundizar en los efectos adversos que tiene $A\beta_{1-42}$ sobre las diversas proteínas de asociación a los microtúbulos (MAP's), abre las puertas a diseñar mejores estrategias terapéuticas para tratar de dar un mejor tratamiento a pacientes con una enfermedad tan compleja como lo es la enfermedad de Alzheimer.

PERSPECTIVAS

Esta es la primera vez que se describe la interacción entre $A\beta_{1-42}$ y un dominio de interacción de microtúbulos de la proteína MAP1B expresado en la superficie del fago filamentoso M13. Dada la importancia del hallazgo, se están realizando varios experimentos en el laboratorio con el fin de profundizar más en los datos de la interacción de estas dos proteínas.

Entre los experimentos en progreso se encuentra la expresión del fragmento de MAP1B en forma recombinante para realizar pruebas de ELISA y así comprobar la interacción entre $A\beta_{1-42}$ y MAP1B. Diversas pruebas de neuroprotección están siendo realizadas para probar si el bloqueo de la unión entre $A\beta$ y MAP1B puede tener algún efecto benéfico para la sobrevivencia de las neuronas *in vitro*. Por otro lado se está determinando si las alteraciones en MAP1B por la acción de $A\beta$ puede estar alterando la localización de diversos organelos como las mitocondrias.

BIBLIOGRAFIA

Alvarez, J., Moreno, R. D y Inestrosa, N. C. Mitosis of Schwann cells and demyelination are induced by the amyloid precursor protein and other protease inhibitors in the rat sciatic nerve. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 152-159 (1995).

Arendt, T. *Neuroscience*. Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization. **102**, 723-765 (2001).

Backsai, B. J., Kajdasz, S. T., McLellan, M. E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D y Hyman, B. T. Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid- β in vivo by immunotherapy. *J. Neurosci.* **22**, 7873-7878 (2002).

Bailleul, P. A., Newman, G. P., Steenberger, J. N y Chernoff, Y. O. Genetic study of interactions between the cytoskeletal assembly protein sla 1 and prion-forming domain of the release factor Sup35 (eRF3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **153**, 81-94 (1999).

Balass, M., Heldman, Y., Cabilly, S., Givol, D., Katchalaski, K y Fuchs, S. Identification of a hexapeptide that mimics a conformation dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10638-10642 (1993).

Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H y Mandelkow, E. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 y cdk5. *FEBS. Lett.* **336**, 417-424 (1993).

Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K y Silvermann, G. J. 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 432 p.

Bhardwaj, D., Singh, S. S., Abrol, S y Chaudhary, V. K. Monoclonal antibodies against a minor and the major coat proteins of filamentous phage M13: their application in phage display. *J. Immunol. Meths.* **179**, 165-175 (1995).

Binder, L. I., Frankfurter, A., Kim, H., Caceres, A., Payne, M. R y Rebhun, L. I. Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 5613-5617 (1984).

Blass. J. P. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J. Neurosci.* **66**, 851-856 (2001).

Bloom, G. S., Luca, F. C y Valee, R. B. Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 5404-5408 (1985).

Boland, K., Manias, K y Perlmutter, D. H. Specificity in recognition of amyloid-beta peptide by the serpin-enzyme complex receptor in hepatoma cells and neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 28022-28028 (1995).

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A y Hof, P. R. Tau protein isoforms phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* **33**, 95-130 (2000).

Bush, A. I., Masters, C. L y Tanzi, R. E. Copper, beta-amyloid, and Alzheimer´s disease: tapping a sensitive connection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 11193-11194 (2003).

Calvert, R. y Anderton, B.H. A microtubule-associated protein (MAP1) that is expressed at elevated levels during development of the rat cerebellum. *EMBO. J.* **4**, 1171-1176 (1985).

Cataldo, A. M., Peterhoff, C. M., Troncoso, J. C., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T y Nixon, R. A. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer´s disease an Down syndrome – differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am. J. Pathol.* **157**, 277-286 (2000)

Choo, Y. y Klung, A. Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals code interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11168-11172 (1994).

Chou, P. Y y Fasman, G. D. Predictions of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* **47**, 45-147 (1978).

Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J. y Ashe, K. H. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* **8**, 79-84 (2005).

Coles, M., Bicknell, W., Watson, A. A., Fairlie, D. P y Craik, D. J. Solution structure of amyloid β -peptide (1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is?. *Biochemistry.* **37**, 11064-11077 (1998).

Cook, D. G., Forman, M. S., Sung, J. C., Leight, S., Kolson, D. L., Iwatsubo, T., Lee, V. M y Doms, R. W. Alzheimer's A beta (1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat. Med.* **3**, 1021-1023 (1997).

Cortese, I., Tafi, R., Grimaldi, L. M. E., Martino, G., Nicosia, A y Cortese, R. Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiple sclerosis using phage libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 11063-11067 (1996).

Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L y Nuñez, J. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 4378-4381 (1992).

Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H. W., Spijkers, P., Guo, H., Song, X., Lenting, P. J., Van Nostrand, W. E y Zlokovic, B. V. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron.* **43**, 333-344 (2004).

Delacourte, A. Tauopathies: recent insights into old diseases. *Folia Neuropathol.* **43**, 244-257 (2005).

Delmastro, P., Meola, A., Monaci, P., Cortese, R y Galfre, G. Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes alter oral administration. *Vaccine.* **15**, 1276-1285 (1997).

Desai, P. P., Ikonovic, M. D., Abrahamson, E. E., Hamilton, R. L., Isanski, B. A., Hope, C. E., Klunk, W. E., DeKosky, S. T y and Kamboh, M. I. Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiol. Dis.* **20**, 574-582 (2005).

Dewachter, L y Van Leuven, F. Secretases as targets for the treatment of Alzheimer´s disease: the prospects. *Lancet Neurol.* **1**, 409-416 (2002).

Dickson, D. W. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 321-339 (1997).

Djojonegoro, B. M., Benedik, M. J y Wilson, R. C. Bacteriophage surface display of an immunoglobulin-binding domain of *Staphylococcus aureus* protein A. *Biotechniques.* **12**, 169-172 (1994).

Drewes, G., Lichtenberg- Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M y Mandelkow, E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into Alzheimer-like state. *EMBO. J.* **11**, 2131-2138 (1992).

Dybwad, A., Forre, O., Natvig, J. B y Sioud, M. Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from RA patients: A novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library. *Clinical Immunol. Immunopathol.* **75**, 45-50 (1995).

Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., and Illenberger, S., Trinczek, B y Mandelkow, E. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondrias, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer´s disease. *J. Cell. Biol.* **143**, 777-794 (1998).

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J. T., Pesold, B., Steiner, H. y Hass, C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 486-488 (2003).

Faber, P. W., Barnes G. T., Srinidhi, J., Chen, J., Gusella, J. F y McDonald, M. E. Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1463-1474 (1998).

Ferrer, M y Harrison, S. Peptide ligands to human immunodeficiency virus type 1gp 120 identified from Phage Display libraries. *J. Virol.* **73**, 5795-5802 (1999).

Fifre, A., Sponne, I., Koziel, V., Kriem, B., Yen-Potin, F. T., Bihain, B. E., Olivier, J., Oster, T y Pillot, T. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid β -peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspasa-3. *J. Biol. Chem.* **281**, 229-240 (2006).

Frenkel, D., Dori, M y Solomon, B. Generation of anti-beta-amyloid antibodies via phage display technology. *Vaccine.* **22**, 2505-2508 (2004).

Gabuzda, D., Busciglio, J., Chen, L. B., Matsudaira, P. y Yankner, B. A. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidegenic derivate. *J. Biol. Chem.* **269**, 13623-13628 (1994).

García-Pérez, J., Avila, J y Díaz-Nido, J. Implication of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 in the phosphorylation of microtubule-associated protein 1B in developing neuronal cells. *J. Neurosci. Res.* **52**, 445-452 (1998).

Garnier, J., Osguthorpe, D. J y Robson, B. Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120 (1978).

Gevorkian, G., Maonotcharian, K., Almagro, J. C., Govezensky, T y Dominguez, V. Identification of autoimmune Trombocytopenic Purpura. Related epitopes using Phage Display peptide library. *Clinical Immun. and Immunopathology.* **86**, 305-309 (1998).

Germaschewsk, V y Murray, K. Identification of polyclonal serum specificities with Phage Display libraries. *J. Virol. Methods.* **58**, 21-32 (1996).

Glenner, G. G., Henry, J. H y Fujihara, S. Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer´s degeneration. *Ann. Pathol.* **1**, 120-129 (1981).

Glenner, G. G. y Wong, C. W. Alzheimer´s disease and Downs´s syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1131-1135 (1984).

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D y Crowter, R. A. Multiple isoforms of human microtubule –associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer´s disease. *Neuron.* **3**, 519-526 (1989).

Gonzalez-Billault, C y Avila J. Molecular genetic approaches to microtubule-associated protein function. *Histol. Histopathol.* **15**, 1177-1183 (2000).

Gonzalez-Billault, C., Avila, J y Cáceres, A. Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2087-2098 (2001).

Gonzalez-Billault, C., Jimenez-Mateos, E. M., Cáceres, A., Díaz-Nido, J., Wandosel, F y Avila, J. Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J. Neurobiol.* **58**, 48-59 (2004).

Gordon-Weeks, P. R., Mansfield, S. G., Alberto, C., Johnstone, M y Moya, F. A phosphorylation epitope on MAP1B that is transiently expressed in growing axons in de developing rat nervous system. *Eur. J. Neurosci.* **5**, 1302-1311 (1993).

Greene, L. A., Liem, R. K. H y Shelanski, M. L. Regulation of a high molecular weight microtubule-associated protein in PC12 cells by nerve growth factor. *J. Cell. Biol.* **96**, 76-83 (1983).

Hahley, R. W y Rall, S.C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **1**, 507-537 (2000).

Hammarback, J. A., Obar, R. A., Huges, S. M., y Valle, R. B. MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule binding domain. *Neuron.* **7**, 129-139 (1991).

Hardy, J y Allsop, D. Amyloid deposition as a central event in the aetiology of Alzheimer´s disease. *Trends. Pharmacol.* **12**, 383-388 (1991).

Hardy, J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer´s disease. *Trends Neurosci.* **20**, 154-159 (1997).

Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, C y Beyreuther, K. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer´s disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* **3**, 1016-1020 (1997).

Hartmann, T. Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **249**, 291-298 (1999).

Hartvedt, K., Dechassa, M. L., Robben, J y Volckaert, G. Identification of Ga180p-interactions proteins by *Saccharomyces cerevisiae* whole genome phage display. *Gene.* **307**, 141-147 (2003).

Hasegawa, M., Arai, T y Ihara, Y. Immunochemical evidence that fragments of phosphorylated MAP5 (MAP1B) are bound to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuron.* **4**, 909-918 (1990).

Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Kowa, H., Hosoda, R., Nakamura, A., Kanazawa, I., Arai, T., Takio, K., Mann, D. M. A y Iwatsubo, T. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO. J.* **21**, 1524-1534 (2002).

Hirano, A. Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol. App. Neurobiol.* **20**, 3-11 (1994).

Hirokawa, N., Bloom, J. S y Vallee. Cytoskeletal architecture and immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins in regions of axons associated with rapid axonal transport: the β, β' - iminodipropionitrile-intoxicated axon as a model system. *J. Cell. Biol.* **101**, 227-239 (1985).

Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Müller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., De Quervain, D. J. F., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A y Nitsch, R. M. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron.* **38**, 547-554 (2003).

Honer, W.G. Assessing the machinery of mind: synapses in neuropsychiatric disorders. *J. Psychiatry. Neurosci.* **24**, 116-121 (1999).

Iñiguez, P., Zientara, S., Marault, M., Machin, I., Hannant, D y Cruciere, C. Screening of horse polyclonal antibodies with a random peptide library displayed on phage: Identification of ligands used as antigens in an ELISA test to detect the presence of antibodies to equine arteritis virus. *Journal of Virological Methods.* **73**, 175-183 (1998).

Iqbal, K., Alonso, A., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Abdur, R., Tanimukai, H y Grundke-Iqbal, I. Tau pathology in Alzheimer´s disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1739**, 198-210 (2005).

Jimenez-Mateos, E. M., Gonzalez-Billault, C., Dawson, H. N., Vitek, M. P y Avila, J. Role of MAP1B in axonal retrograde transport of mitochondria. *Biochem. J.* In press (**2006**).

John, V., Beck, J. P., Bienkowski, M. J., Sinha, S y Heinrichson, R. L. Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors. *J. Med. Chem.* **46**, 4625-4630 (2003).

Jonsson, K., Guo, B. P., Monstein, H. J., Mekalanos, J. J y Kronvall, G. Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 1852-1857 (2004).

Joslin, G., Krause, J. E., Hershey, A. D., Adams, S. P., Fallon R. J y Perlmutter, D. H. Amyloid-beta peptide, substance P, and bombesin bind to the serpin-enzyme complex receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 21897-21902 (1991).

Julien, J. P y Mushynski, W. E. Neurofilaments in health and disease. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **61**, 1-23 (1998).

Kang, C. K., Jayasinha, V y Martin, P. Identification of peptides that specifically bind A β ₁₋₄₀ amyloid in vitro and amyloid plaques in Alzheimer´s disease brain using phage display. *Neurobiol. Dis.* **14**, 146-156 (2003).

Kazee, A. M y Han L. Y. Cortical Lewy bodies in Alzheimer´s disease. *Arch. Path. Lab. Med.* **119**, 448-453 (1995).

Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guenette, S. Y. y Selkoe, D. J. The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a Notch-like manner. *J. Biol. Chem.* **276**, 40288-40292 (2001).

Koo, E. H y Squazzo, S. L. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 17386-17389 (1994)

Kosik, K. S., Crandall, J. E., Mufson, E. J y Neve, R. L. Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. *Ann. Neurol.* **26**, 352-361 (1989).

Kotilinek, L. A., Bacskar, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B. T., Younkin, S y Ashe, K. H. Reversible memory lost in a mouse transgenic model of Alzheimer´s disease. *J. Neurosci.* **22**, 6331-6335 (2002).

Kuner, P., Schubengel, R y Hertel, C. β -amyloid binds to p75^{NTR} and activates NF κ B un human neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* **54**, 798-804 (1998)

Larson, J., Lynch, G., Games, D y Seubert, P. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res.* **840**, 23-35 (1999).

Le, Y., Gong, W., Tiffany, H. L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N. M., Gao, J., Murphy, P. M., Oppenheim, J. J y Wang, J. M. Amyloid (beta) 42 activates G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J. Neurosci.* **21**, RC123 (2001).

Lee, J., Duan, W y Mattson, M. P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* **82**, 1367-1375 (2002).

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J. *et al.* Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer´s disease locus. *Science.* **269**, 973-977 (1995).

Li, S., Gutekunst, C. A., Hersch, S. M y Li, X. Interaction of huntingtin associated protein with dynactin p15^{Glued}. *J. Neurosci.* **18**, 1261-1269 (1998).

Lien, L., Feerner, C. A., Fischbach, N y Kunkel, L. M. Cloning of human microtubule associated protein 1B and the identification of a related gene on chromosome 15. *Genomics.* **22**, 273-280 (1994).

Lindwall, G y Cole, R. D. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubules assembly. *J. Biol. Chem.* **259**, 5301-5305 (1984).

LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S. C., Zinkowski, R. P y Binder, L. I. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 10369-10373 (1995).

Lowman, H. B., Bass, S. H., Simpson, N y Wells, J. A. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry.* **30**, 10832-10838 (1991).

Lowman, H. B. y Wells, J. A. Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J. Mol. Biol.* **234**, 564-578 (1993).

Lubke, U., Six, J., Villanova, M., Boons, J., Vandermeeren, M., Ceuterick, C., Cras, P y Martin, J. J. Microtubule-associated protein tau epitopes are present in fiber lesions in diverse muscle disorders. *Am. J. Pathol.* **145**, 175-188 (1994).

Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R y Mandelkow, E. Glycogen synthase kinase-3 and alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS. Lett.* **314**, 315-321 (1992).

Manoutcharian, K., Sotelo, J., García, E., Cano, A y Gevorkian, G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using Phage Display peptide library. *Clinical Immunology.* **91**, 117-121 (1999).

Manoutcharian, K., Gevorkian, K., Cano, A y Almagro, J. C. Phage-displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2**, 217-223 (2001).

Manoutcharian, K., Acero, G., Munguia, M. E., Montero, J. A., Govezensky, T., Cao, C., Ugen, K y Gevorkian, G. Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from immuned phage display library. *J. Neuroimmunol.* **145**, 12-17 (2003).

Manoutcharian, K., Acero, G., Munguía, M. E., Becerril, B., Massieu, L., Govezensky, T., Ortiz, E., Marks, J. D., Cao, C., Ugen, K y Gevorkian, G. Human single chain Fv antibodies and complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol. Dis.* **17**, 114-121 (2004).

Mansfield, S. G., Díaz-Nido, J., Gordon-Weeks, P. R y Avila, J. The distribution and phosphorylation of MAP1B in growth cones. *J. Neurocytol.* **21**, 1007-1022 (1992).

Mayeux, R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 81-104 (2003).

Mattson, M. P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* **77**, 1081-1132 (1997).

Mattson, M. P y Chan, S. L. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer´s disease. *Cell Calcium.* **34**, 385-397 (2003).

Mattson, M. P. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann. Intern. Med.* **139**, 441-444 (2003).

Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer disease. *Nature.* **430**, 631-639 (2004).

McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M.E., Tian, X., Phinney, A. L., Manea, M., French, J. E., Lambermon, M. H. L., Darabie, A. A., Brown, M. E., Janus, C., Chishti, M. A., Horne, P., Westaway, D., Fraser, P. E., Mount, H. T. J., Przybylski, M y St. George-Hyslop, P. Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Med.* **8**, 1263-1269 (2002).

McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I y Masters, C. L. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46**, 860-866 (1999).

Meixner, A., Haverkamp, S., Wässle, H., Führer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R. E., Lassman, H., Wiche, G y Propst, F. MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* **151**, 1169-1178 (2000).

Michaelis, M. L. Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. *J. Pharmacol. Exp Ther.* **304**, 897-904 (2003).

Morgan, C., Colombres, M., Nuñez, M. T y Inestrosa, N. C. Structure and function of amyloid in Alzheimer´s disease. *Prog. Neurobiol.* **74**, 323-349 (2004).

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

Munguia, M. E., Govezensky, T., Martinez, R., Manoutcharian, K y Gevorkian, G. Identification of amyloid-beta 1-42 binding protein fragments by screening of a human brain cDNA library. *Neurosci. Lett.* **397**, 79-82 (2006).

Noble, M., Lewis, S. A y Cowan, N. J. The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J. Cell Biol.* **109**, 3367-3373 (1989).

Ono, T., Sekino-Suzuki, N., Kikkawa, Y., Yonekawa, H y Kawashima, S. Alivin1, a novel neuronal activity-dependent gene, inhibits apoptosis and promotes survival of cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* **23**, 5887-5896 (2003).

Palzkill, T., Huang, W y Weinstock, G. M. Mapping protein-ligand interactions using hole genome Phage Display libraries. *Gene.* **221**, 79-83 (1998).

Papasozomenos, S. C. Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type I. Morphology, evolution, distribution and pathogenic implications. *Lab. Invest.* **60**, 123-137 (1989).

Pasternak, S. H., Callahan, J. W y Mahuran, D. J. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid beta production and the pathophysiology of Alzheimer´s disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J. Alzheimers Dis.* **6**, 53-65 (2004)

Pericak-Vance, M. A., Bass, M. P., Yamaoka, L. H., Gaskell, P.C., Scott, W. K., Terwedow, H. A., Menold, M. M., Conneally, P. M., Small, G. W., Vance, J. M., Saundres, A. M., Roses, A. D y Haines, J. L. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer´s disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA.* **278**, 1237-1241 (1997).

Perry, G., Friedman, R., Shaw, G y Chau, V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaques neuritis of Alzheimer disease brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 3033-3036 (1987).

Perry, G., Cras, P., Siedlak, S. L., Tabaton, M y Kawai, M. β -protein immunoreactivity is found in the majority of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **140**, 283-290 (1992).

Reinhard, C., Hebert, S. S y De Strooper, B. The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO. J.* **24**, 3996-4006 (2005).

Rhyner, C., Kodzius, R y Cramer, R. Direct isolation of cDNAs from filamentous phage surface display libraries: potential and limitations. *Curr. Pharm Biotechnol.* **3**, 13-21 (2002).

Riederer, B. M., Cohen, R y Matus, A. MAP5: a novel brain microtubule-associated protein under strong developmental regulation. *J. Neurocytol.* **15**, 763-775 (1986).

Riederer, B. M., Moya, F y Calvert, R. Phosphorylated MAP1B, alias MAP5 and MAP1X, is involved in axonal growth and neuronal mitosis. *Neuroreport.* **4**, 771-774 (1993).

Ritchie, C. W., Bush, A. I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., MacGregor, L., Kiers, L., Cherny, R., Li, Q., Tammer, A., Carrington, D., Mavros, C., Volitakis, I., Xilinas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R, E y Masters, C. L. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol.* **60**, 1685-1691 (2003).

Robben, J., Hartvedt, K., Bosmans, E., Volckaert, G. Selection and identification of dense granule antigen GRA3 by *Toxoplasma gondii* whole genome phage display. *J. Biol. Chem.* **277**, 17544-17547 (2003).

Ronald, L y Hamilton, M. D. Lewy bodies in Alzheimer's disease: A neuropathological review of 145 cases using α -synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol.* **10**, 378-384 (2000).

Rosenblatt, D. E., Geula, C y Mesulam, M. M. Protease nexin I immunostaining in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **26**, 628-634 (1989).

Russel, M. Phage assembly: a paradigm for bacterial virulence factor export. *Science.* **265**, 612-614 (1994)

Sabo, S., Lambert, M. P., Kessey, K., Wade, W., Krafft, G y Klein, W. L. Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line. *Neurosci. Lett.* **184**, 25-28 (1995).

Sambrook, J y Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N. Y. pp 1.25-1.26.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D y Seubert, P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* **400**, 173-177 (1999).

Schoenfeld, T. A., McKerranher, L., Obar, R y Vallee, R. B. MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J. Neurosci.* **9**, 1712-1730 (1989).

Scott, J. K. y Smith, G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* **249**, 386-390 (1990).

Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer´s disease. *Neuron.* **6**, 487-498 (1991)

Selkoe, D. J. Alzheimer´s Disease: genes, proteins and therapy. *Physiol. Rev.* **81**, 741-766 (2001).

Selkoe, D. J. y Schenk, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545-584 (2003).

Sergeant, N., Bombois, S., Ghestem, A., Drobecq, H., Kostanjevecki, V., Missiaen, C., Wattez, A., David,, J., Vanmechelen, E., Sergheraert, C y Delacourte, A. Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer´s disease as anew targets for the vaccination approach. *J. Neurochem.* **85**, **1581-1591** (2003).

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Ichi, H., Lin, C., Li, G, *et al.* Cloning of a novel gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer disease. *Nature.* **375**, 754-760 (1995).

Skovronsky, D. M., Doms, R. W y Lee, V. M. Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture. *J. Cell. Biol.* **141**, 1031-1039 (1998)

Smith, G. P. Surface display and peptide libraries. *Gene*. **128**, 1-2 (1993).

Smith, G. P y Petrenko, V. A. Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391-410 (1997).

Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M y Perry, G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9866-9868 (1997).

Smothers, J. F., Henikoff, S y Carter, P. Tech. Sight. Phage display, Affinity selection from biological libraries. *Science*. **298**, 621-622 (2002)

Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Nair, A. C., Salter, M. W., Lombrosos, P. J., Gouras, G. K y Greengard, P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* **8**, 1051-1058 (2005).

Solomon, B. Generation of anti- β -amyloid antibodies via phage display technology towards Alzheimer´s disease vaccination. *Vaccine*. **23**, 2327-2330 (2005).

Soumillion, P., Jaspers, L., Bouchet, M., Marchand-Brynaert, J., Winter, G., y Fastrez, J. Selection of betalactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.* **237**, 415-422 (1994).

Stein, T. D., Anders, N. J., DeCarli, C, Chan, S. L., Mattson, M. P y Johnson, J. A. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J. Neurosci.* **24**, 7707-7717 (2004).

Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Periak-Vance, M. y Enghild, J. Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1977-1981 (1993).

Tagliavini, F., Giaccone, G., Frangione, B y Bugiani, O. Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer´s disease and non demented individuals. *Neurosci. Lett.* **93**, 191-196 (1988).

Takahashi, H., Hirokawa, K., Ando, S y Obata, K. Immunohistological study on brains of Alzheimer's disease using antibodies to fetal antigens, C-series gangliosides and microtubule-associated protein 5. *Acta Neuropathol.* **81**, 626-631 (1991).

Tanzi, R. E y Bertram, L. New frontiers in Alzheimer´s disease genetics. *Neuron.* **32**, 181-184 (2001).

Tanzi, R. E. The synaptic hypothesis of Alzheimer disease. *Nat. Neurosci.* **8**, 977-979 (2005).

Tucker, R. P., Garner, C. C y Matus, A. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron.* **2**, 1245-1256 (1989).

Tukamoto, T., Nukina, N., Ide, K y Kanazawa, I. Huntington´s disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Mol. Brain. Res.* **51**, 8-14 (1997).

Turner, R. S., Suzuki, N., Chyung, A. S., Younkin, S. G y Lee, V. M. Amyloids beta40 and beta42 are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation. *J. Biol. Chem.* **271**, 8966-8970 (1996).

Uchida, Y. Overexpression of full length but not N-terminal truncated isoforma of microtubule-associated protein 1B accelerates apoptosis of cultured cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **278**, 366-371 (2003)

Ulloa, L., Avila, J y Díaz-Nido. Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J. Neurochem.* **61**, 961-972 (1993).

Ulloa, L., Díaz-Guerra, J., Avila, J y Díaz-Nido, J. Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) into axons and dendrites of cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience.* **61**, 211-223 (1994)

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, S. M., Rowan, M. J. y Selkoe, D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* **416**, 535-539 (2002a).

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J y Selkoe, D. Amyloid- β oligómeros: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 552-557 (2002b).

Wang, H. Y., Lee, D. H., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P y Reitz, A. B. Beta-amyloid (1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* **275**, 5626-5632 (2000).

Wanker, E. E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J y Lehrach, H. HIP-1: A huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 487-495 (1997).

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S y Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **72**, 1858-1862 (1975).

Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q y Lee, V. M. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 9513-9517 (1993)

Wiesehan, K., Buder, K., Linke, R. P., Patt, S., Stoldt, M., Unger, E., Schmitt, B, Bucci, E y Willbold, D. Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide abeta1-42 by mirror image phage display. *Chembiochem.* **4**, 748-753 (2003).

Williams, R. J., Henderson, B., Sharp, L. J y Nair, S. P. Identification of fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermitis*. *Infect. Immun.* **70**, 6508-6810 (2002).

Wilson, C. A., Doms, R. W y Lee, V. M. Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 787-794 (1999).

Xia, X., Ray, W. J., Ostaszewski, B. L., Rahmati, T., Kimberly, W. T., Wolfe, M. S., Zhang, J., Goate, A. M y Selkoe, D. J. Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid beta-protein generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 9299-9304 (2000).

Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Bronswijk, W y Martins, R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J. Neurosci.* **22**, RC221 (2002).

Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A. C., Sisodia, S. S., Greengard, P y Gandy, S . 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- 3752 (1997)

Xu, Y., Shen, J., Luo, X., Zhu, W., Chen, K., Ma, J y Jiang, H. Conformational transition of amyloid β -peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***102**, 5403-5407 (2005).

Yan, S., Zhu, H., Fu, J., Yan, S. F., Roher, A., Tourtellotte, W. W., Rajavashisth, T., Chen, X., Godman, G. C., Stern, D y Schmidt, A. M. Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 5296-5301 (1997).

Zervas, M., Opitz, T., Edelmann, W., Wainer, B., Kucherlapati, R y Stanton, K. Impaired hippocampal long-term potentiation in microtubule associated protein 1B-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* **82**, 83-92 (2005).

Zhang, H., Zhong, Z y Pirofsky, L. A. Peptide epitopes recognized by a human anti-cryptococcal glucuronoxylomannan antibody. *Infect. Innunology.* **65**, 1158-1164 (1997).

Zhang, S., Iwata, K., Lachenmann, M. J., Peng, J. W., Li, S., Stimson, E. R., Lu, Y. A., Felix, A. M., Maggio, J. E y Lee, J. P. The Alzheimer´s peptide A β adopts a collapsed coil structure in water. *J. Struct. Biol.* **130**, 130-141 (2000).

Zhang, Y., Hong, Y., Bounhar, Y., Blacker, M., Roucou, X., Tounekti, O., Vereker, E., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Goodyer, C. G y LeBlanc, A. p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid beta peptide cytotoxicity. *J. Neurosci.* **23**, 7385-7394 (2003).