



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Análisis de la expresión diferencial de proteínas asociadas a la neurodegeneración en fibroblastos y células precursoras neurales (NPCs) derivadas de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer”**

**T E S I S**

Que presenta

**GUSTAVO LÓPEZ TOLEDO**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**Directores de la Tesis**

Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Ciudad de México

Noviembre, 2022

# AGRADECIMIENTOS



- Agradezco al CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.
- Al Cinvestav-IPN por la formación académica y científica de calidad, así como por la infraestructura y equipo otorgado a lo largo de dicho proyecto.
- A la UNAM por el apoyo en infraestructura y equipo durante el desarrollo del proyecto.
- A los apoyos económicos recibidos para poder realizar la investigación: el apoyo de los proyectos DGAPA/PAPIIT/UNAM número IA208118 e IA210620 y CONACYT número 319578.

# DEDICATORIA

..... A mis padres

..... A ti

..... A mi familia de Oaxaca y Veracruz

## Agradecimientos

*A mis directores de proyecto (Dr. Arias y Dra. Mari Carmen) por todos los conocimientos a lo largo de este proyecto, su apoyo y sobre todo la confianza que depositaron en mí.*

*A mis asesores de proyecto (Dr. Nahmad y Dr. Ubaldo) por todo su apoyo y disposición en el desarrollo del proyecto. Al Dr. Fidel y la Dra. Yazmín por asistir el proceso de revisión y la realimentación de esta tesis.*

*A los miembros del Laboratorios de Reprogramación Celular, a la Técnico Académico: M. en C. Mireya Velázquez Paniagua.*

*A los del Laboratorio 37 de Neurociencias, gracias por los buenos momentos compartidos.*

*A mis amigos del Cinvestav que me enseñaron los diversos caminos del posgrado.*

*A los nuevos compañeros del Departamento de Fisiología Facmed-UNAM que me animan en mi nueva etapa.*

# ÍNDICE

i.	Lista de tablas .....	6
ii.	Lista de figuras .....	7
iii.	Abreviaturas .....	10
1.	Resumen .....	14
2.	Abstract .....	16
4.	Marco teórico.....	21
4.1.	Enfermedad de Alzheimer .....	21
4.1.1.	Clasificación de la EA .....	21
4.1.2.	Cambios moleculares en la EA.....	26
4.1.2.1.	Vías autofágica-lisosomal y del proteasoma en la EA.....	28
4.1.2.2.	Cinasas en la EA e hiperfosforilación de la proteína tau .....	35
4.1.2.3.	Toxicidad del péptido Amiloide $\beta$ en la EA .....	40
4.1.2.4.	Estrés celular y proteínas de choque térmico en la EA .....	42
4.1.3.	Modelos de estudio de la EA .....	44
4.1.3.1.	Modelos de células somáticas (fibroblastos) en la EA .....	46
4.1.3.2.	Células precursoras neurales diferenciadas a partir de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes con la EA. ....	48
4.1.4.	Proteómica en la Enfermedad de Alzheimer.....	50
4.1.5.	RNA-seq en la Enfermedad de Alzheimer .....	52
5.	Justificación.....	55
6.	Objetivos .....	57
6.1.	Objetivo general.....	57
6.2.	Objetivos particulares .....	57
7.	Metodología.....	58
7.1	Cultivo celular .....	58
7.1.1.	Fibroblastos humanos.....	58
7.1.2.	Células precursoras neurales (NPCs) derivadas de iPSCs .....	59
7.2.	Cariotipo .....	60
7.3.	Inmunofluorescencia.....	60
7.4.	Análisis <i>in silico</i> (GEO2) .....	61
7.5.	Western Blotting .....	62

7.6. Proteómica.....	64
7.6.2. Geles 2-DE y análisis.....	65
7.6.4. Procesamiento de datos e identificación de proteínas.....	67
7.6.5. Análisis bioinformático de perfiles de proteínas obtenidos por espectrometría de masas (bases de datos Panther y String) .....	67
7.7. Análisis estadístico .....	67
7.8. RNA-seq .....	68
7.8.1. Extracción de RNA y preparación de bibliotecas de transcriptomas a partir Células Precursoras Neurales (NPCs) derivadas de iPSCs de pacientes afectados con la EA e individuos controles .....	68
7.8.2. Procedimiento de análisis bioinformático para la cuantificación de genes del grupo afectado respecto al control. ....	69
7.8.3. Procesamiento de secuencias de RNA.....	69
7.8.4. Análisis de secuencias de RNA.....	70
7.9. Estrategias de trabajo .....	71
8. Resultados .....	73
8.1. Cultivo y caracterización de fibroblastos de pacientes afectados con la EA y controles.....	73
8.2. Análisis de la expresión proteica diferencial entre los fibroblastos afectados con la EA y los controles mediante Western Blot.....	77
8.3. Proteómica.....	82
8.3.1. Geles de 2-DE .....	82
8.3.1. Análisis bioinformático de los perfiles proteicos obtenidos por la espectrometría de masas (Bases de datos Panther y String).....	86
8.4. Cultivo y caracterización de NPCs-iPSCs afectados con la EA y controles .....	92
8.5. RNA-seq de NPCs-iPSCs derivados de pacientes afectados con la EA familiar y controles .....	94
9. Discusión.....	101
10. Conclusiones.....	132
11. Perspectivas.....	133
12. Anexos .....	134
13. Bibliografía .....	143

## i. Lista de tablas

Número de tabla	Título	Página
1	Importancia relativa de los sitios específicos de fosforilación de la proteína tau en la función de las cinasas	39
2	Líneas de fibroblastos de pacientes afectados con la EA familiar y controles	58
3	Líneas de NPCs de pacientes con la EA familiar y controles	59
4	Anticuerpos usados en inmunofluorescencia y protocolos de Western blot	63
5	Genes asociados con neurodegeneración en la EA identificados en análisis de expresión diferencial de la base de datos de microarreglos GEO2R número de acceso GSE39420	77
6	Spots identificados en los geles 2-DE de los fibroblastos afectados con la EA y controles	85
Suplementaria 1	Perfil proteico representativo de fibroblastos afectados con la EA familiar (EA1 y EA2) y controles (NA2 y NA3) derivado del análisis de espectrometría de masas	135

## ii. Lista de figuras

Número de figura	Título	Página
1	Mutaciones de las proteínas Presenilina 1, Presenilina 2 y A $\beta$ PP	22
2	Componentes del complejo de $\gamma$ -secretasa y sitios de escisión en la A $\beta$ PP	23
3	Procesamiento de A $\beta$ PP por las secretasas	24
4	Factores de riesgo asociados a la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádica	25
5	Genes relacionados con la predisposición y el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer	26
6	Vías de señalización molecular y procesos funcionales afectados en la Enfermedad de Alzheimer	27
7	Clasificación de la autofagia	30
8	Sistema autofágico	31
9	Degradación lisosomal de la carga autofágica	32
10	Sistema ubiquitina-proteasoma	34
11	Estructura, isoformas, dominios, modificaciones e interacciones de la proteína tau	36
12	Estrategia de análisis de modelos celulares derivados de pacientes con la EA (Justificación)	56
13	Abordaje metodológico para el modelo de células fibroblásticas	71
14	Abordaje metodológico para el modelo de células de NPCs-iPSCs	72
15	Cultivo de fibroblastos obtenidos de pacientes afectados con la EA y controles	73
16	Expresión de Vimentina y S100A4 en fibroblastos con mutaciones en PS1 (EA) y fibroblastos sin la mutación (NA)	74
17	Cariotipos de fibroblastos de individuos afectados con la EA y sujetos control	76
18	Inmunodetección de marcadores autofágicos (SQSTM1 y LC3II), lisosomales (LAMP2 y CatD)	79

	y proteasomales (PSMB5) en fibroblastos de individuos afectados con la EA	
19	Inmunodetección de marcadores de supervivencia celular (pAKT-Serina <sup>473</sup> ), fosforilación de cinasas involucradas en la hiperfosforilación de la proteína tau (GSK3 $\alpha$ -Serina <sup>21</sup> , GSK3 $\beta$ -Serina <sup>9</sup> y ERK-1/2 Treonina <sup>202</sup> /Tirosina <sup>204</sup> ) en fibroblastos de individuos afectados con la EA	80
20	Inmunodetección de la proteína precursora de amiloide (A $\beta$ PP) y fosforilaciones patológicas de la proteína tau (Treonina231, Treonina181, Serina404 y Serina396) en fibroblastos afectados con la EA	81
21	Cambios en la expresión de proteínas en fibroblastos de pacientes afectados con la EA familiar (EA1 y EA2) y fibroblastos de individuos control (NA2 y NA3)	83
22	Comparación de puntos ( <i>spots</i> ) empleando un gel de referencia de proteínas derivadas de fibroblastos de piel	84
23	Clasificación ontológica de la función molecular de las proteínas identificadas en fibroblastos derivados de paciente (EA1 y EA2) e individuos control (NA2 y NA3)	87
24	Procesos celulares correspondientes a las proteínas identificadas en los fibroblastos derivados de los pacientes (EA1 y EA2) y los individuos control (NA2 y NA3)	88
25	Grupo de proteínas de respuesta al estrés (HSP) identificadas en los extractos proteicos de los fibroblastos de pacientes con la EA familiar (EA1 y EA2) con la mutación M146L	89
26	Inmunodetección de los marcadores de estrés celular HSP90, HSP70 y HSP60 en fibroblastos de pacientes con la EA	91
27	Cultivo de NPCs-iPSCs de pacientes afectados con la EA y controles	92
28	Expresión de $\beta$ III-Tubulina en NPCs-EA3, con mutación en PS1 (M146L), y NPCs-NA8 control	93



29	Expresión de las proteínas Nestina y KI67 en NPCs-EA3 con mutación en PS1 (M146L) y NPCs-NA8 control	93
30	Normalización de datos de expresión derivados de RNA-seq a partir de NPCs de pacientes con Alzheimer y controles	95
31	Agrupación de perfiles transcripcionales de las NPCs de pacientes con la EA y controles	95
32	Gráfico de volcán de los genes expresados diferencialmente (DEG), regulados a la alza y a la baja al comparar muestras de NPCs-iPSCs de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) y muestras control	96
33	Mapa de calor de la expresión de DEG (escala logarítmica) en muestras de pacientes con la EA e individuos controles	97
34	Análisis de la ontología génica de función molecular de los genes expresados diferencialmente en las NPCs afectadas con la EA y controles	99
35	Análisis de la ontología génica de componente celular de los genes expresados diferencialmente en las NPCs afectadas con la EA y controles	99
36	Superposición de DEG en muestras de NPCs-iPSCs de pacientes con mutación en PS1 (EA familiar) y el perfil proteico de fibroblastos dérmicos de pacientes afectados con mutación en PS1 (EA familiar)	100
37	Alteraciones moleculares en vías de señalización asociadas a neurodegeneración en fibroblastos derivados de pacientes con la EA familiar por mutación en PS1	117
Figura suplementaria 1	Árbol genealógico de la familia italiana de los individuos con EA familiar (PS1-M146L)	134
Figura suplementaria 2	Árbol genealógico de la familia canadiense de los individuos con EA familiar (PS1-A246E)	134

### iii. Abreviaturas

2-DE	Dos dimensiones
AD, EA	<i>Alzheimer Disease, Enfermedad de Alzheimer</i>
ADAM10	Proteína 10 con dominio de desintegrina y metaloproteínasa
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
APOE	Apolipoproteína E
APP $\alpha$	Proteína precursora de amiloide soluble $\alpha$
APP $\beta$	Proteína precursora de amiloide soluble $\beta$
ATG	Gen relacionado con la autofagia
ATP	Trifosfato de adenosina
A $\beta$	Amiloide- $\beta$
A $\beta$ PP	Proteína precursora de amiloide
A $\beta$ PP-CTF	Fragmento carboxi-terminal de la proteína precursora de amiloide
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
C59	Fragmento carboxi-terminal 59
C83	Fragmento carboxi-terminal 83
C99	Fragmento carboxilo-terminal 99
CA	Control Alzheimer
CaMKII	Cinasa II activada por calcio/calmodulina
CatD	Catepsina D
CCT	Chaperonina que contiene al polipéptido 1 complejo sin cola
CDK5	Cinasa 5 dependiente de ciclina
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CNTRL	Control
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEA	Análisis de expresión diferencial
DEG	Genes expresados diferencialmente

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUB	Desubiquitinante
DYRK	Cinasa regulada por tirosina de doble especificidad
E1K	Deshidrogenasa de $\alpha$ -cetoglutarato
EA	Enfermedad de Alzheimer
A $\beta$	Amiloide- $\beta$
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GAPDH	3-fosfato deshidrogenasa de gliceraldehído
GBS	Solución amortiguadora de fosfatos con glucosa
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GO	Ontología génica
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSK3	3-Cinasa de la sintasa de glucógeno
GTP	Trifosfato de guanosina
HSP	Proteína de choque térmico
IP3	Trifosfato de inositol
iPSCs	Células Troncales Pluripotentes Inducidas
JNK	Cinasa Amino-terminal c-Jun
KDa	Kilodalton
LAMP	Proteína de membrana asociada a lisosomas
LC	Cromatografía líquida
LC3	Proteína asociada a microtúbulos 1A/1B de cadena ligera 3
A $\beta$ PP	Proteína precursora de amiloide
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAPK	Cinasa de proteína activada por mitógenos
MARK	Cinasa reguladora de la afinidad de proteínas asociadas a microtúbulos

MEM	Medio esencial mínimo
MS	Espectrometría de masas
mTOR	Blanco de la rapamicina en mamíferos
Mw	Peso molecular
NA	No afectado
NFT	Maraña neurofibrilar
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPCs	Células Precursoras Neurales
P3	Péptido 3
PCA	Análisis de componente principal
PDL3	Fosfolipasa D3
PDPK	Cinasa dirigida a Prolina
PHF	Filamento helicoidal apareado
PhK	Cinasa fosforilasa
PI3K	3-cinasa de fosfatidilinositol
PIP3	3-fosfato de fosfatidilinositol
pI-pH	Punto isoeléctrico o pH isoeléctrico
PKA	Cinasa A de proteína
PKB	Cinasa B de proteínas
PKC	Cinasa C de proteínas
PKN	Cinasa N1 de serina/treonina
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
PSMB	Subunidad $\beta$ del proteasoma 20S
ptau	Proteína tau fosforilada
PTM	Modificación postraducciona
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAD	<i>Sporadic Alzheimer's Disease</i>

SADK	Cinasa SAD
SFB	Suero Fetal Bovino
SFK	Cinasa de la familia Src
sHSP	Proteínas de choque térmico pequeñas
SNC	Sistema Nervioso Central
SQSTM1	Sesquestosoma 1
SRC	Cinasa Sarc
TPK	Cinasa de tirosina
TREM	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 1
TTBK	Cinasa tau-tubulina
ULK1/2	Cinasa activadora de la autofagia similar a Unc-51
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
UTR	Región no traducida
v-ATPasa	ATPasa vacuolar
VDAC	Canales de aniones dependientes de voltaje
VPS	Proteínas vacuolares
WIPI	Proteína de interacción con fosfoinosítidos
YKL-40	Proteína 1 similar a la quitinasa 3

## 1. Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que puede ocurrir en la mediana edad o en la vejez y que se caracteriza por la pérdida de la memoria, así como por la disminución continua de la capacidad del pensamiento, alteraciones en el comportamiento y las habilidades sociales que afectan la capacidad de un individuo para funcionar de manera independiente. La EA se divide en dos subtipos esporádico y familiar. La EA familiar de inicio temprano (FAD, por sus siglas en inglés) está relacionada con mutaciones en los genes que codifican a la proteína precursora del amiloide- $\beta$  (A $\beta$ PP), la presenilina 1 (PS1) y la presenilina 2 (PS2), que conducen a alteraciones en el procesamiento de A $\beta$ PP, con la consecuente generación del péptido amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ) y la hiperfosforilación de la proteína tau. La identificación de biomarcadores tempranos para el diagnóstico de la EA representa un desafío, y se ha sugerido que los cambios moleculares en las vías neurodegenerativas identificadas en el cerebro de pacientes con la EA pueden detectarse en células periféricas no neuronales y en modelos neurales derivados de la reprogramación celular como las células precursoras neurales (NPCs) de pacientes con EA familiar o esporádica (SAD). En el presente estudio, determinamos la expresión de proteínas asociadas a neurodegeneración en la EA, mediante la caracterización proteómica e *in silico* de fibroblastos de piel de pacientes con la EA familiar que portan mutaciones en PS1 (M146L o A246E) e individuos sanos. Así mismo, en NPCs derivadas de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) con mutación en PS1 (A246E, M146L o L286V) y sujetos sanos, y mediante secuenciación de RNA total (RNA-seq), se analizaron los cambios de expresión génica entre ambos grupos. Los fibroblastos de pacientes con la EA presentaron un incremento significativo en la expresión de los marcadores de autofagia LC3II, LAMP2 y Catepsina D, así como un aumento significativo en la expresión total de GSK3, en la fosforilación de ERK-1/2 (Treonina<sup>202</sup>/Tirosina<sup>204</sup>) y las fosforilaciones patológicas de la proteína tau (Treonina<sup>231</sup>, Serina<sup>396</sup> y Serina<sup>404</sup>), sin observar

diferencia significativa en la fosforilación de Akt (Serina<sup>473</sup>) o las fosforilación de las isoformas  $\alpha$  (Serina<sup>21</sup>) y  $\beta$  (Serina<sup>9</sup>) de GSK3. Los geles 2-DE y la espectrometría de masas mostraron diferencias significativas en la expresión de moléculas relacionadas con vías de señalización asociadas al plegamiento de proteínas, la vía autofágica mediada por chaperonas y el estrés reticular, dado por la expresión de HSPA5, HSPD1, HSP90AA1 y HSPE1 en los fibroblastos de individuos con la EA familiar. La mayor expresión de las proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70 en las células de pacientes con la EA fue confirmada por Western blot. El análisis de expresión diferencial (DEA) de genes en las células precursoras neurales derivadas de las células troncales pluripotentes inducidas (NPCs-iPSCs) de pacientes con la mutación en PS1 mostró cambios moleculares asociados a vías de señalización de los receptores acoplados a proteína G, elementos del lumen de retículo endoplásmico, moléculas de unión a calcio, componentes de membrana celular, así como de unión a citoesqueleto, y la intersección del perfil proteico de los fibroblastos con mutación en la PS1 y los genes expresados diferencialmente en las NPCs de los pacientes afectados con la EA familiar evidenció que la expresión de las moléculas S100A6, LGALS1, HSPB1, SERPINH1, HSPA9, CAVIN1, EEF1A y ANXA2 se encuentra elevada tanto en células periféricas como en células del sistema nervioso central. En conjunto, los resultados obtenidos indican que los fibroblastos de pacientes con la EA familiar dado por mutación en la PS1 presentan alteraciones en las vías de señalización relacionadas con estrés celular, autofagia, lisosomas y fosforilación de la proteína tau, y el modelo de NPCs mostró moléculas compartidas con la periferia asociadas a señalización transmembranal, estrés reticular y regulación de la dinámica de calcio. Por lo tanto, los fibroblastos y las NPCs pueden ser útiles en el modelado de vías relacionadas con la neurodegeneración, así como para la identificación de biomarcadores tempranos de la EA.

## 2. Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder that can occur in middle or old age. AD is characterized by memory loss and continued decline in the capability to think, alterations in behavior, and social skills that affect the individual's ability to function independently. AD is divided into two subtypes, sporadic and familial. Early-onset familial AD (FAD) is associated with mutations in genes encoding the proteins Amyloid- $\beta$  precursor protein (A $\beta$ PP), presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2), which lead to alterations in A $\beta$ PP processing, with the subsequent generation of Amyloid  $\beta$  peptide (A $\beta$ ) and hyperphosphorylation of the protein tau. The identification of early biomarkers for AD diagnosis is a challenge, and it has been suggested that molecular changes in neurodegenerative pathways identified in the brain of AD patients can also be also detected in peripheral non-neuronal cells and neural models derived from AD cellular reprogramming such as neural precursor cells (NPCs) from patients with familial or sporadic AD. In the present study, we determined the expression of proteins associated with neurodegeneration in AD through proteomic and in silico characterization of skin fibroblasts from patients with FAD caused by mutations in PS1 (M146L or A246E) and healthy individuals. Furthermore, NPCs derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) with a mutation in PS1 (A246E, M146L or L286V) or healthy subjects were used to perform RNA-seq and analyze changes in gene expression between controls and patient-derived cells groups. The obtained results showed that the fibroblasts of patients with AD presented a significantly higher expression of the autophagy markers LC3II, LAMP2 and Cathepsin D, as well as a significant increase in the total expression of GSK3, the phosphorylation of ERK-1/2 (Threonine<sup>202</sup>/Tyrosine<sup>204</sup>) and the pathological phosphorylation of the protein tau (Threonine<sup>231</sup>, Serine<sup>396</sup>, and Serine<sup>404</sup>), without differences in the phosphorylation of Akt (Serine<sup>473</sup>) or the isoforms  $\alpha$  (Serine<sup>21</sup>) and  $\beta$  (Serine<sup>9</sup>) of GSK3. In addition, 2-DE gels and mass spectrometry showed significant differences in the expression of molecules related to signaling pathways



associated with protein folding, the autophagic pathway mediated by chaperones and reticular stress, namely the expression of HSPA5, HSPD1, HSP90AA1 and HSPE1 in fibroblasts from individuals with familial AD. Western blot analysis confirmed the higher expression of heat shock proteins HSP90 and HSP70 in cells of AD patients. The analysis of the differential expression of genes in NPCs-iPSCs of patients with a mutation in PS1 showed molecular changes associated with the signaling pathways of G protein-coupled receptors, elements of the endoplasmic reticulum lumen, calcium binding molecules, cell membrane components, and cytoskeleton binding components, The intersection between the protein profile of fibroblasts with a mutation in PS1 and genes differentially expressed in the NPCs of patients affected with familial AD showed that the molecules S100A6, LGALS1, HSPB1, SERPINH1, HSPA9, CAVIN1, EEF1A and ANXA2 are found overexpressed in both peripheral cells and cells of the central nervous system. The results indicate that fibroblasts from patients with FAD-PS1 present alterations in signaling pathways related to cellular stress, autophagy, lysosomes, and the phosphorylation of the protein tau. The NPCs model showed molecules shared with peripheral cells and associated with transmembrane signaling, reticular stress, and regulation of calcium dynamics. Therefore, fibroblasts and NPCs may be useful in modeling pathways related to neurodegeneration, as well as for the identification of early AD biomarkers.

### 3. Introducción

La Organización Mundial de Salud (OMS) estima que a nivel mundial existen 50 millones de personas con demencia y que se reportan 7.7 millones de casos nuevos al año. En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición realizada en el año 2012 reportó una prevalencia de demencia en adultos mayores de 7.9%, por lo que de acuerdo con la Federación Mexicana de Alzheimer se calcula que en México actualmente existen cerca de 900,000 casos de Alzheimer en México y se estima que para el año 2050, si no antes, el número de mexicanos afectados por la Enfermedad de Alzheimer (EA) será de más de 3.5 millones.

La EA es la principal causa de demencia, ya que representa entre el 60 y 70% de los casos. La EA es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de memoria, así como de neuronas y sinapsis, lo que resulta en una atrofia de las regiones afectadas como el hipocampo, la circunvolución cingulada y la corteza prefrontal. La EA se distingue por dos lesiones histopatológicas a nivel cerebral, las placas neuríticas generadas por la agregación del péptido Amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) y las marañas neurofibrilares formadas por la agregación de la proteína tau hiperfosforilada. La patología se clasifica como EA de tipo esporádico y EA de tipo familiar.

Entre los modelos implementados para el estudio de la EA, se encuentran los modelos murinos y las muestras cerebrales de pacientes, los cuales han permitido comprender parcialmente los mecanismos moleculares asociados a la EA como el procesamiento de la Proteína Precursora Amiloidea ( $A\beta$ PP), la hiperfosforilación de la proteína tau, la señalización por receptores de membrana y la regulación del ion calcio; así mismo, el uso de células periféricas, como los fibroblastos, y el advenimiento de las células precursoras neurales derivadas de la reprogramación celular de células periféricas de pacientes afectados con la EA han contribuido a la comprensión molecular de una patología exclusiva de humanos.

Aún existen mecanismos moleculares asociados a neurodegeneración que no han sido caracterizados en su totalidad, como el estrés mitocondrial y reticular, la vía autofágica y lisosomal, la vía del proteasoma, el depósito de proteínas agregadas y procesos de neuroinflamación. Por lo anterior, el uso de modelos celulares derivados de pacientes con la EA, como los fibroblastos y las NPCs-iPSCs, representa una estrategia promisoriosa para el entendimiento de los mecanismos asociados a neurodegeneración en la EA, y su posible uso en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

El presente trabajo pone en evidencia que las células periféricas, en particular fibroblastos de pacientes con la EA familiar, presentan cambios moleculares en vías asociadas a neurodegeneración, tales como la autofágica-lisosomal, con el aumento en la expresión de las proteínas LC3II, LAMP2 y CatD, de cinasas relacionadas con la hiperfosforilación de la proteína tau, observado como un aumento en la expresión total de la cinasa GSK3 y de las fosforilaciones de activación Treonina<sup>202</sup> y Tirosina<sup>204</sup> de ERK-1/2, así como un incremento de las fosforilaciones patológicas de la proteína tau (Treonina<sup>231</sup>, Serina<sup>396</sup> y Serina<sup>404</sup>). Así mismo, el perfil proteico del grupo afectado con la EA determinado por análisis proteómico mostró que los fibroblastos expresan proteínas asociadas a estrés celular como las proteínas de choque térmico (HSP), lo que fue validado por inmunodetección, detectándose que los fibroblastos con la EA presentan aumento de HSP90 y HSP70.

Mediante el análisis de secuenciación del transcriptoma completo (RNA-seq) se identificó que las NPCs-iPSCs de pacientes con la EA familiar presentan expresión diferencial de genes asociados con señalización celular mediada por GPCRs, moléculas de unión a calcio, elementos de membrana celular y retículo endoplásmico, así como moléculas de citoesqueleto. Además, se determinó que las moléculas S100A6, LGALS1, HSPB1, SERPINH1, HSPA9, CAVIN1, EEF1A y ANXA2 que son expresadas diferencialmente en las NPCs de los individuos con la EA, se comparten a nivel periférico con fibroblastos de pacientes afectados con mutación en PS1.

Este estudio pone en evidencia que las células periféricas de pacientes y los modelos neurales derivados de la reprogramación de células somáticas con EA presentan alteraciones a nivel molecular y que estas alteraciones periféricas son compartidas por modelos celulares del sistema nervioso como las NPCs, por lo que representan opciones promisorias para la identificación de biomarcadores periféricos y blancos terapéuticos para la EA.

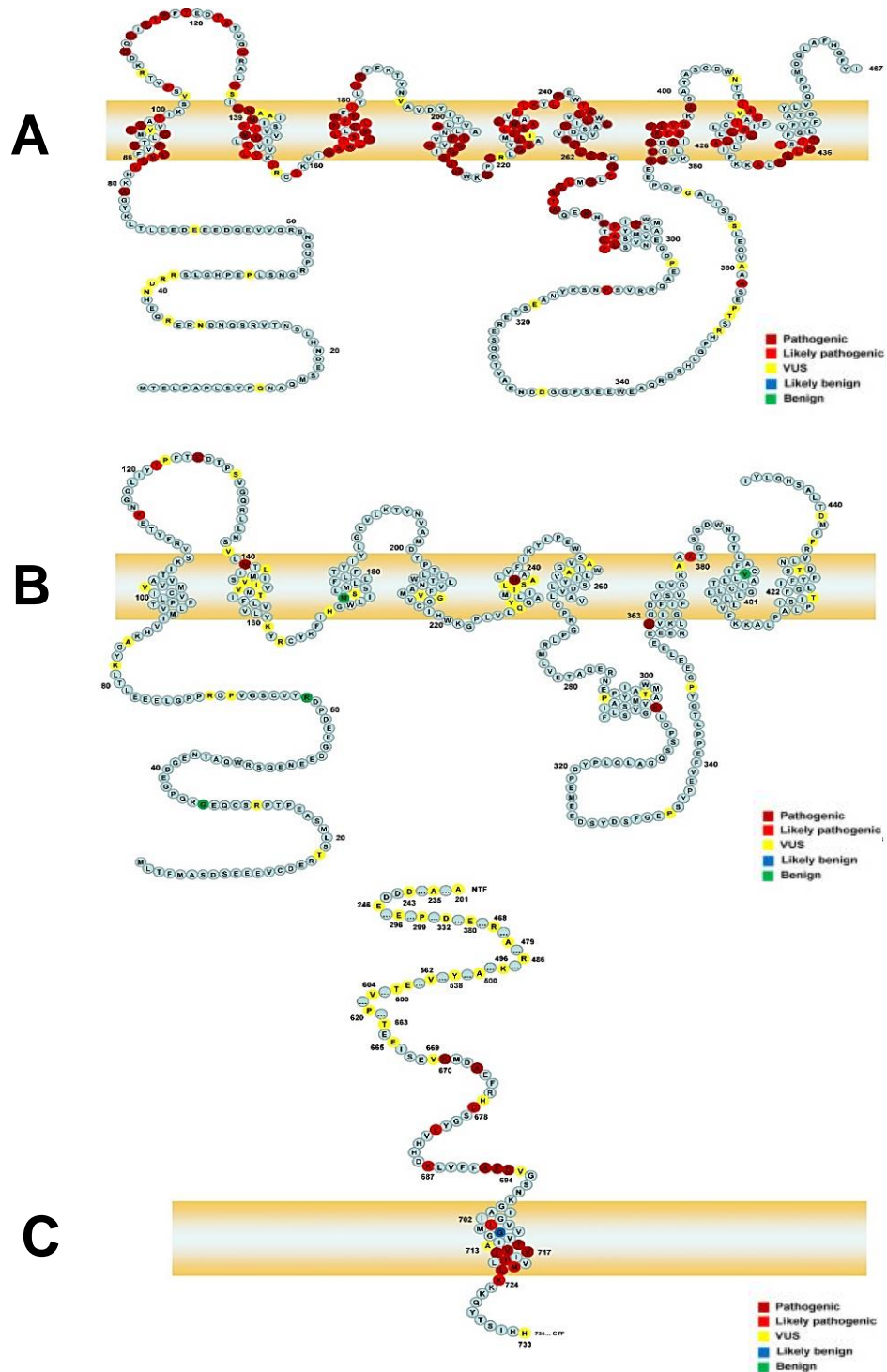
## **4. Marco teórico**

### **4.1. Enfermedad de Alzheimer**

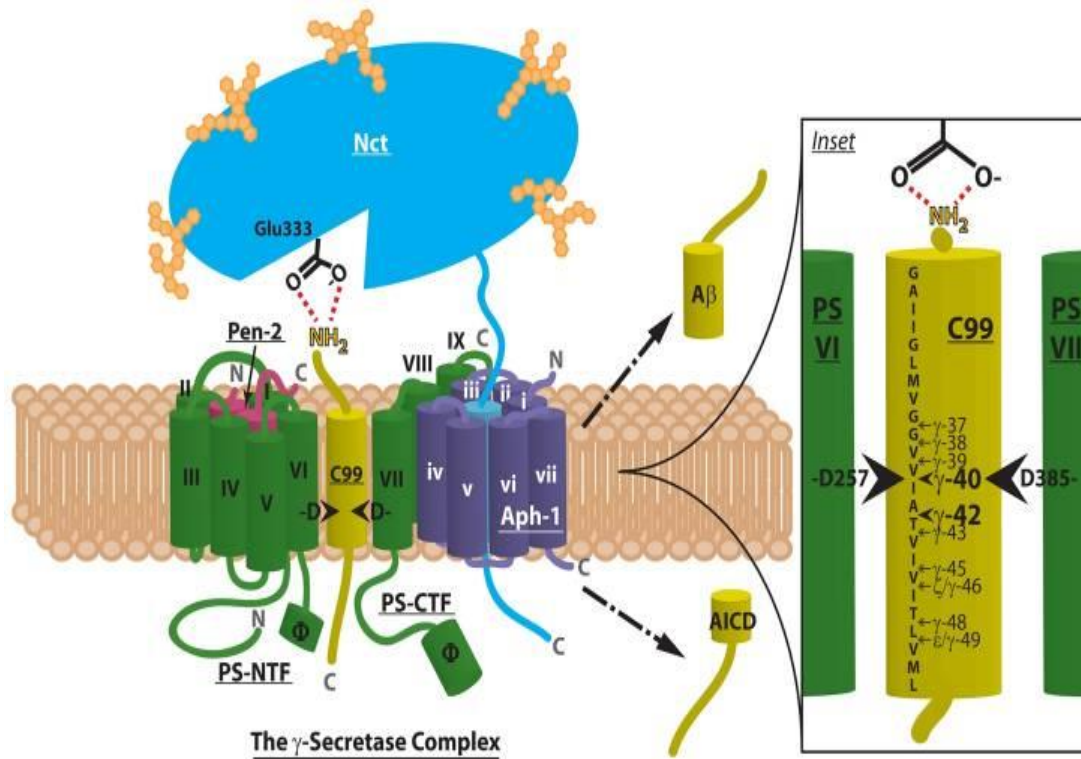
La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia representando aproximadamente el 60% de los casos, y se caracteriza por el deterioro de la memoria, la conducta, la capacidad intelectual y el desarrollo de actividades cotidianas, que no son consecuencia del envejecimiento (OMS, 2022). Los cerebros de los pacientes con la EA presentan placas amiloides extracelulares compuestas por el péptido A $\beta$  y de marañas neurofibrilares intracelulares formadas por la proteína tau hiperfosforilada, asociadas a la pérdida de las sinapsis y muerte neuronal, así como a la subsecuente atrofia cerebral de los pacientes (Lane et al., 2018).

#### **4.1.1. Clasificación de la EA**

La identificación de la participación del péptido A $\beta$  y de la proteína tau hiperfosforilada en la EA proviene de los estudios de casos de la EA tipo familiar de inicio temprano (1% de casos), con mutaciones en la A $\beta$ PP, Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 2 (PS2) (Figura 1). La A $\beta$ PP es la proteína precursora de los péptidos de A $\beta$  y las mutaciones en el gen correspondiente afectan su escisión y la formación y agregación del péptido A $\beta$ . Las PS1 y PS2 forman parte de la subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa (Figura 2), encargado de la escisión de la A $\beta$ PP en la vía amiloidogénica en conjunto con el complejo  $\beta$ -secretasa (Figura 3). Las mutaciones en las presenilinas se relacionan con un procesamiento menos eficaz de la A $\beta$ PP y la generación de péptidos más largos e hidrofóbicos (Li et al., 2016).



**Figura 1. Mutaciones de las proteínas Presenilina 1, Presenilina 2 y AβPP.** A y B) Esquema de la secuencia completa de aminoácidos de las PS1 y PS2. C) Esquema de la secuencia de aminoácidos de la AβPP. Cada círculo en color representa la probabilidad de patogenicidad. Círculos guinda: variantes patogénicas; Círculos rojos: probables variantes patogénicas; Círculos amarillos: variantes de significado incierto; Círculos azules: probablemente variantes benignas; Círculos verdes: variantes benignas (Xiao et al., 2021).



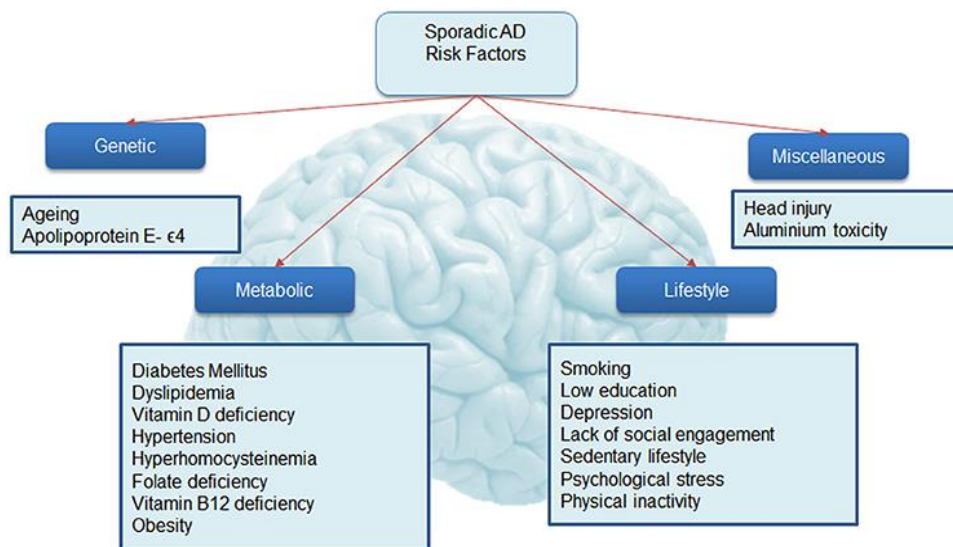
**Figura 2. Componentes del complejo de  $\gamma$ -secretasa y sitios de escisión en la A $\beta$ PP.** El complejo de  $\gamma$ -secretasa (izquierda) se compone de cuatro proteínas: presenilina 1 (PS1, verde), nicastrina (Nct, azul claro), Aph-1 (morado) y PS2 (rosa). La PS1 se escinde en la región hidrófoba ( $\Phi$ ) para producir los fragmentos N- terminal y C-terminal (PS1-NTF y PS1-CTF). Los residuos catalíticos de ácido aspártico, Asp<sup>257</sup> y Asp<sup>385</sup>, se encuentran en el dominio transmembranal 6 (TMD6) (VI) y 7 (VII). El residuo Glu<sup>333</sup> del dominio DAP de Nct se une al amino N-terminal de A $\beta$ PP para posicionarse en el sitio activo de la  $\gamma$ -secretasa. La Nct es una proteína altamente glicosilada (naranja) en complejos activos de la  $\gamma$ -secretasa. El heterodímero Nct-Aph-1 se une a PS1-CTF a través del TMD4 (IV) de Aph-1. La PS2 está rodeada por interacciones con PS1-NTF. La PS2 y el TMD1 de PS1 parecen modular el sitio activo. En el recuadro se observa que la  $\gamma$ -secretasa escinde A $\beta$ PP (amarillo) en múltiples sitios dentro de su dominio transmembranal. Los péptidos A $\beta$  resultantes se nombran según su longitud desde el extremo N-terminal, y A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 (negritas) representan la mayoría de las especies de péptido A $\beta$  producidas (Dries y Yu, 2008).



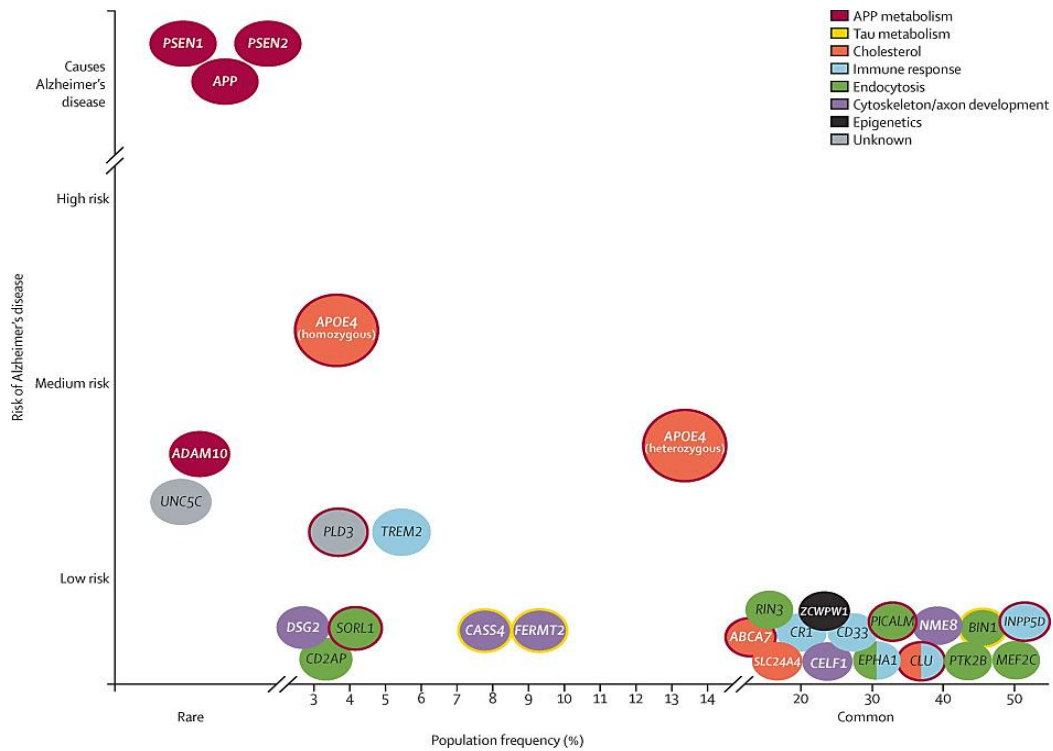


El diagnóstico *post-mortem* de la EA, requiere de la detección de los dos tipos de lesiones histopatológicas: las placas neuríticas y las marañas neurofibrilares, por lo que la participación de la proteína tau también es importante para confirmar la EA; sin embargo, las mutaciones en el gen de la proteína tau solo causan demencia fronto-temporal sin presencia de placas neuríticas, lo que indica que la proteína tau puede inducir neurodegeneración independientemente del péptido A $\beta$ . Se considera que las alteraciones patológicas de la proteína tau son eventos posteriores a la deposición del A $\beta$  o que ambas proteínas actúan paralelamente en el desarrollo de la EA (Scheltens et al., 2016).

La EA de tipo esporádico de inicio tardío (99% de casos) sugiere que existen factores de riesgo relacionados con el estilo de vida, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la obesidad, la inactividad física y mental, la depresión, el tabaquismo, y el bajo nivel educativo y nutricional (Figura 4). Existe también una predisposición genética, y se han identificado polimorfismos en las proteínas APOE4, ADAM10, TREM2 y PDL3 (Figura 5), como factores alélicos que interactúan en el desarrollo de la EA (Guerreiro y Hardy, 2014).



**Figura 4. Factores de riesgo asociados a la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádica.** Asociaciones conocidas con la EA (Lim et al., 2016).

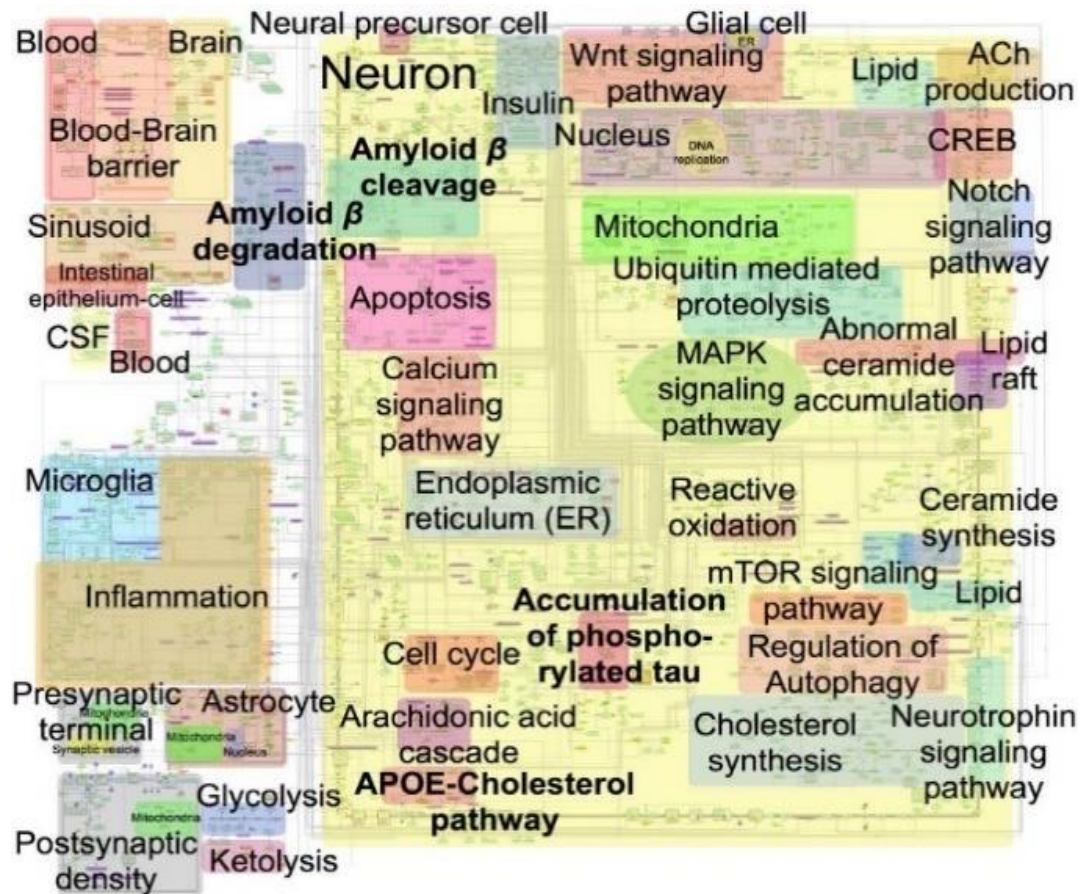


**Figura 5. Genes relacionados con la predisposición y el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.** Los genes que afectan el metabolismo de la A $\beta$ PP se indican con un círculo rojo, y aquellos que afectan las vías de la proteína tau por un círculo amarillo. Los colores interiores proporcionan más información sobre la ruta metabólica vista en la imagen (Scheltens et al., 2016).

#### 4.1.2. Cambios moleculares en la EA

Los pacientes con la EA presentan alteraciones cognitivas, pérdida de la memoria y cambios en el comportamiento. La neurodegeneración asociada a la EA se caracteriza inicialmente por lesiones sinápticas, seguidas de la pérdida neuronal acompañada de astrogliosis, proliferación de la microglía, placas amiloideas y marañas neurofibrilares (Crews y Masliah, 2010). Estos cambios ocasionan alteraciones en las neuronas como el aumento en la velocidad de procesamiento de la A $\beta$ PP, el aumento de la síntesis y degradación del péptido A $\beta$ , del metabolismo del colesterol en la acumulación de APOE, la producción de acetilcolina, la señalización de Wnt y Notch, la

proteólisis mediada por ubiquitinas, la apoptosis, la señalización del calcio, el estrés reticular, la señalización mediada por las MAP cinasas (MAPKs), la síntesis y acumulación de ceramidas, el estrés oxidante, la autofagia, la señalización de las neurotrófinas, el ciclo celular, la vía del ácido araquidónico, la señalización de mTOR, la inflamación, la señalización de la insulina y de CREB, entre otras vías moleculares (Figura 6) (Mizuno et al., 2012).



**Figura 6. Vías de señalización molecular y procesos funcionales afectados en la Enfermedad de Alzheimer.** Se han reportado 34 vías de señalización relacionadas con la EA, como las asociadas con el procesamiento de la A $\beta$ PP, el estrés mitocondrial y la apoptosis, en las que participan alrededor de 1347 moléculas (proteínas, complejos proteicos, genes, mRNA, entre otras), 1070 reacciones metabólicas y 129 fenotipos neuronales de células de barrera hematoencefálica, neuronas presinápticas y postsinápticas, astrocitos y microglia (Mizuno et al., 2012).

#### **4.1.2.1. Vías autofágica-lisosomal y del proteasoma en la EA**

La macroautofagia es una vía de degradación de componentes celulares, mediante la cual los contenidos citoplásmicos se transportan al lisosoma a través vesículas de doble membrana, denominados autofagosomas, para su degradación. La macroautofagia se definió como una vía de degradación masiva y no selectiva tras la privación de nutrientes, y actualmente se conoce que contribuye a la homeostasis intracelular y a la degradación de proteínas agregadas, mitocondrias dañadas, peroxisomas en exceso y patógenos (Figura 7) (Nixon, 2013).

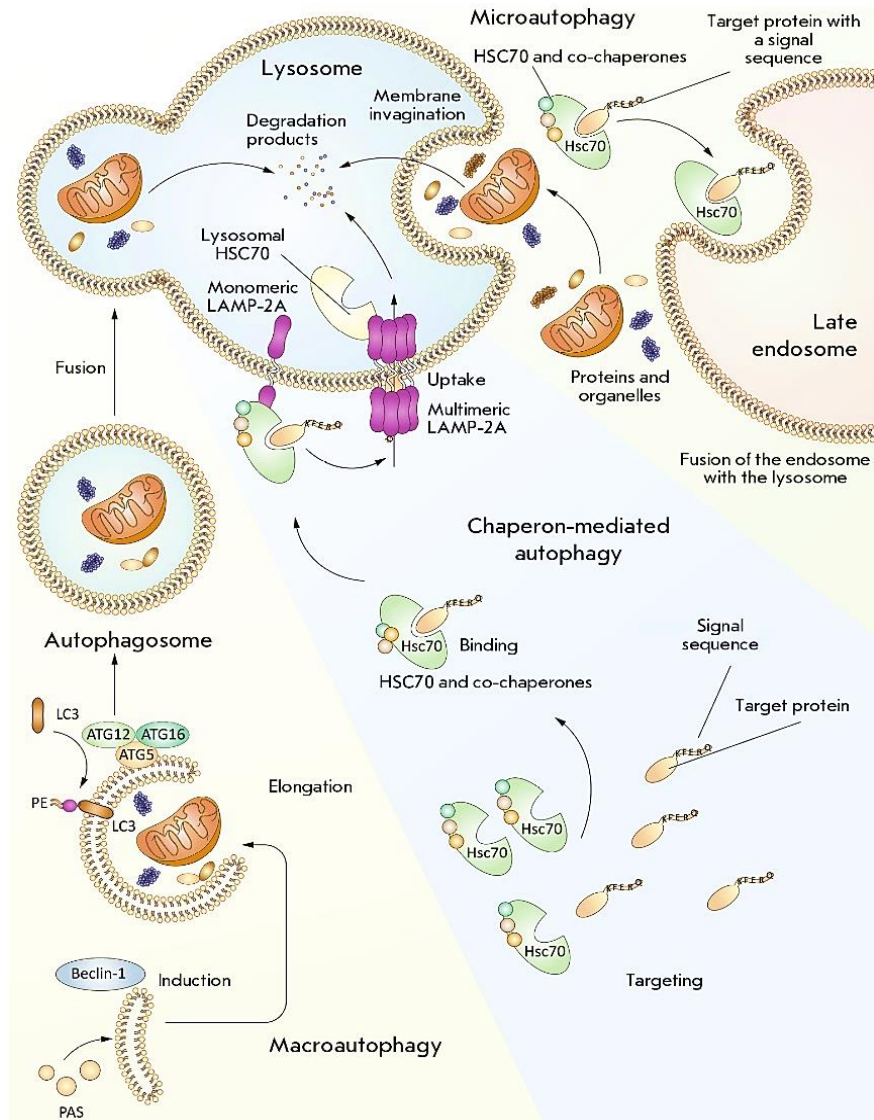
El primer evento de la degradación de proteínas mal plegadas es el etiquetado con cadenas de ubiquitina que son reconocidas por receptores de dominios de unión a ubiquitina como SQSTM1/p62, NBR1, OPTN, TAX1BP1, NDP52, TOLLIP o RPN10. Estos receptores contienen motivos de interacción que reconocen a los autofagosomas a través de secuencias de la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3), funcionando como puente entre los autofagosomas y la carga ubiquitinada para su posterior degradación (Menzies et al., 2017). La activación de la autofagia está mediada por vías de señalización que convergen en ULK1/2, formando un complejo con ATG13, ATG101 y con la proteína de adhesión focal de 200 kDa (FIP200). Se requiere la activación de ULK para el reclutamiento de la proteína VPS34 de la clase III de PI3K así como de VPS14, ATG14 y Beclina-1 a los sitios de iniciación del fagóforo para generar 3-fosfato de fosfatidilinositol (PI3P) y permitir el reclutamiento de proteínas que interactúan con fosfoinosítidos (WIPI) en la membrana del fagóforo, y la posterior incorporación de proteínas río abajo, como ATG16L1 y WIPI2, que determinan dónde se formaran los fagóforos (Dooley et al., 2014; Park et al., 2018).

Los sistemas de conjugación de tipo ubiquitina ATG12 y ATG8/LC3 son necesarios para mantener la expansión del fagóforo. ATG12 se conjuga con ATG5 formando un complejo que asocia de forma no covalente a ATG16L1. Este complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 se asocia a las membranas pre-

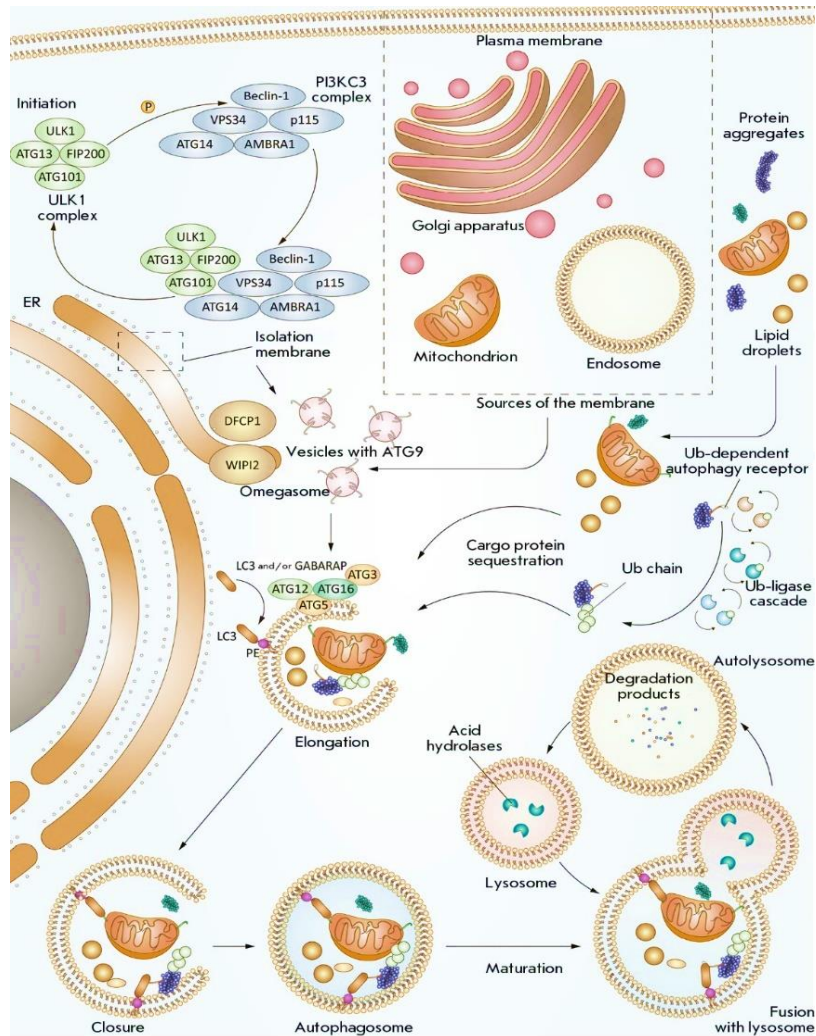
autofagosomales permitiendo su elongación y el reclutamiento de LC3. Antes que LC3 sea reclutada esta proteína tiene que ser escindida en su extremo C-terminal por la proteasa de cisteínas ATG4 para exponer un residuo de cisteína generando la forma I de LC3 (LC3-I). El proceso de escisión es esencial para conjugar LC3-I con fosfatidiletanolamina por un proceso dependiente de ATG7, ATG3 y ATG12-ATG5-ATG16L1, lo que conduce la formación de LC3II empleada como marcador de formación de membranas autofagosomales; esta reacción permite la extensión del borde del fagóforo y su cierre para generar autofagosomas maduros (Figura 8) (Kudriaeva et al., 2020).

Después de este proceso se encuentra la fusión con el lisosoma, y se ha establecido que GTPasas similares a Ras y receptores de proteínas sensibles a la N-etilmaleimida solubles (SNAREs) se encuentran involucradas en este proceso, con la participación del sistema de microtúbulos necesarios para la transferencia de autofagosomas maduros desde el sitio de iniciación a la región perinuclear. Después de la fusión con el autofagosoma, las hidrolasas lisosomales ácidas escinden la carga del autofagosoma y los nutrientes se liberan nuevamente al citoplasma para el reciclaje (Yim y Mizushima, 2020).

Los lisosomas tienen una función importante en la degradación de los organelos celulares, macromoléculas intracelulares y extracelulares. Estos organelos se caracterizan por presentar un lumen altamente ácido (pH ~4.5-5.0). Los lisosomas están rodeados por una membrana de una capa lipídica y contienen alrededor de 60 enzimas hidrolíticas, sulfatasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, lipasas y nucleasas, que permiten una degradación de una gama amplia de sustratos biológicos. La membrana interna está cubierta por una capa gruesa de glucocálix que protege la membrana de las hidrolasas ácidas del lumen. La acidez del lisosoma se genera mediante la presencia en la membrana del organelo de una bomba de protones dependiente de ATP de tipo vacuolar (v-ATPasas), la transferencia de metabolitos, iones, y sustratos solubles hacia y desde el lisosoma.

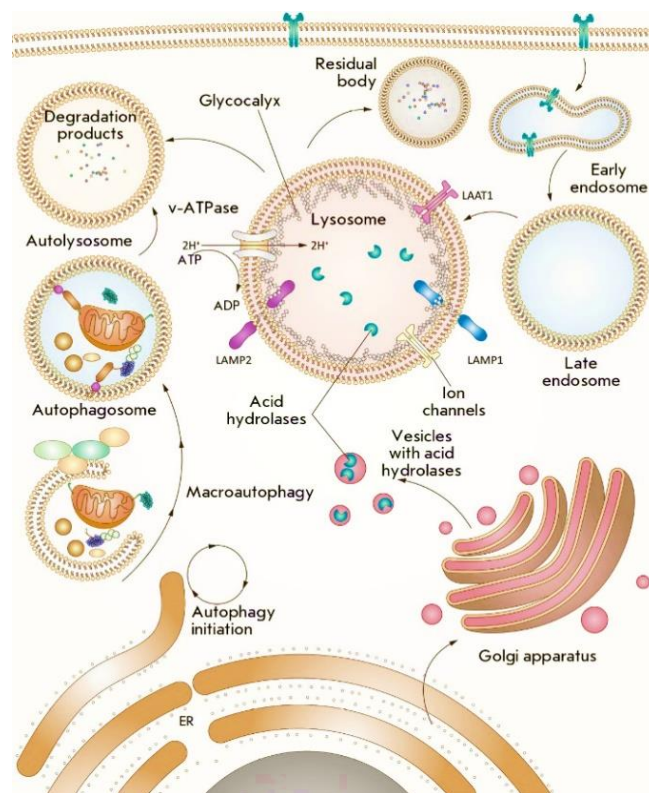


**Figura 7. Clasificación de la autofagia.** La macroautofagia es mediada por proteínas ATG que permiten el inicio de la formación del fagóforo, seguido de la generación de vesículas de doble membrana con contenido celular y culminando con la fusión del autophagosoma con lisosomas que conlleva a la degradación de los contenidos y reciclamiento de las materias primas. En la autofagia mediada por chaperonas la proteína de choque térmico de 70 kDa (*Heat shock protein 70*, HSP70) requiere del reconocimiento de secuencias de carga mediante pentapéptidos KFERQ; el complejo chaperona-sustrato se asocia a la proteína de membrana lisosomal 2A (LAMP2A) permitiendo la traslocación de la carga al interior del lisosoma y la degradación del sustrato, y la microautofagia promueve la degradación directa de organelos y componentes intracelulares mediante entrega directa a los lisosomas (Kudriaeva et al., 2020).



**Figura 8. Sistema autofágico.** El proceso autofágico es iniciado por el estrés, la inanición, la hipoxia, el estrés oxidante, el agregado de proteínas, y el estrés reticular entre otros procesos. El complejo iniciador ULK1 media la nucleación del fagóforo junto con el complejo 1 de la PI3K de clase III; la proteína p115 promueve la producción del 3-fosfato de fosfatidilinositol (PI3P) en un subdominio de la membrana del retículo endoplásmico denominada omeasoma, y la presencia de PI3P permite el reclutamiento de WIP12 y DFCP1. El complejo ATG16L1 favorece la conjugación de proteínas como LC3 con fosfatidiletanolamina mediada por el reclutamiento de ATG3, quien también permite el crecimiento y cierre del fagóforo. LC3 participa en el secuestro de la carga para ser dirigida el autophagosoma a través de secuencias de interacción con LC3. Otras membranas celulares como la plasmática, la mitocondrial, la endosomal y la del aparato de Golgi promueven el crecimiento de la membrana del autophagosoma a través de vesículas de bicapa lipídica que contienen ATG9 (Kudriaeva et al., 2020).

Las glicoproteínas estructurales LAMP1 y LAMP2 son las proteínas más abundantes en la membrana lisosomal, representando más del 50% de las proteínas de membrana (Figura 9). LAMP2 es una importante reguladora de la maduración de los fagosomas y autofagosomas, y la isoforma LAMP2A participa en la autofagia mediada por chaperonas (CMA), en la que las proteínas específicas se dirigen a la degradación en los lisosomas mediante el reconocimiento de un motivo específico en su secuencia de aminoácidos (Ballabio y Bonifacino, 2020; Kenney y Benarroch, 2015; Saftig et al., 2010).



**Figura 9. Degradación lisosomal de la carga autofágica.** Los lisosomas son estructuras de una capa lipídica que contienen proteínas integrales y periféricas, incluyendo alrededor de 60 enzimas hidrolíticas solubles y activadores. LAMP1 y LAMP2 son las proteínas de membrana más abundantes. La ATPasa vacuolar mantiene un entorno ácido estable, necesario para la actividad hidrolítica del lisosoma. El gradiente de protones asegura la transferencia de metabolitos, iones y sustratos solubles necesario para el transporte correcto de las enzimas lisosomales recién sintetizadas desde el aparato de Golgi hacia el lisosoma (Kudriaeva et al., 2020).

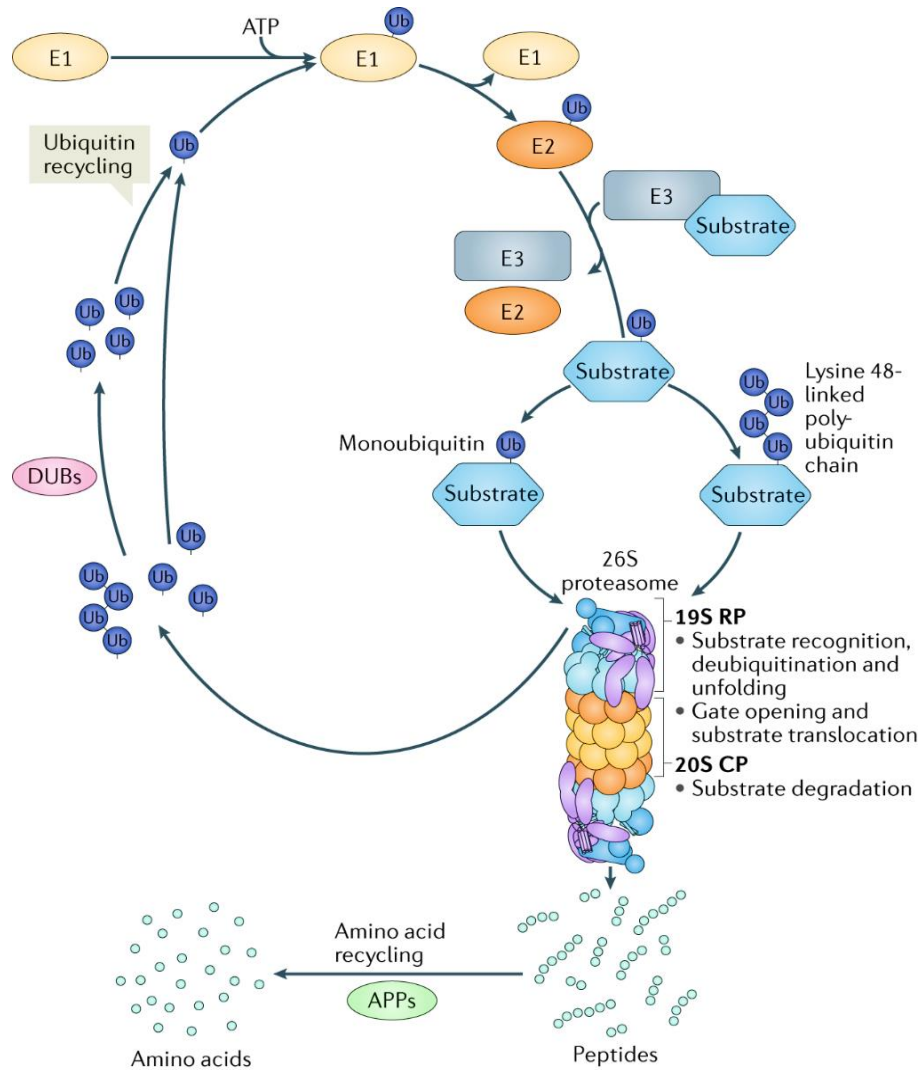


Los sistemas autofágico-lisosomal y la vía ubiquitina-proteasoma son las principales vías de proteólisis intracelular, y el aumento o disminución de su eficacia afectan significativamente el metabolismo celular en la salud y la enfermedad (Rousseau y Bertolotti, 2018).

La proteólisis de proteínas intracelulares mal plegadas y de vida corta ocurre principalmente en la vía del proteasoma, mediante un proceso de coordinación de tres enzimas relacionadas (ligasas E1, E2 y E3), que conjugan proteínas de ubiquitina con sustratos polipeptídicos comprometidos a degradación. El complejo de subunidades múltiples denominado proteasoma 26S reconoce la proteína modificada, y después de la unión al sustrato la cadena de ubiquitina es liberada por la enzima desubiquitinante (DUB) asociada con el proteasoma. Posteriormente, el sustrato se despliega y se traslada a la cavidad interna del proteasoma, donde es procesado en péptidos cortos o en aminoácidos libres (Figura 10) (Marshall y Vierstra, 2019).

Dada su relevancia para la degradación de proteínas, se considera que la disfunción del proteasoma y de la autofagia puede ser la causa principal de muchos de los procesos patológicos relacionados con el envejecimiento, las enfermedades neurodegenerativas como la EA, el cáncer, enfermedades del sistema inmune y de las distrofia musculares asociadas a la proteólisis intracelular (Mizushima, 2018).

Las mutaciones en PS1 que conducen al desarrollo de la EA familiar modifican y aceleran el procesamiento de la A $\beta$ PP (Li et al., 2016). Otra función de PS1 es contribuir como chaperona en el retículo endoplásmico para la subunidad V<sub>0</sub> de la v-ATPasa lisosomal, y en la EA, las mutaciones en PS1 resultan en maduración deficiente de la v-ATPasa lisosomal afectando el pH lisosomal (Lee et al., 2010). Así mismo, la hiperactivación de la enzima GSK3 se considera otro factor de alto riesgo para la EA, ya que participa acidificación deficiente de los lisosomas (Avrahami y Eldar-Finkelman, 2013).



**Figura 10. Sistema ubiquitina-proteasoma.** La ubiquitinación es un proceso que radica en la unión covalente de ubiquitina a sustratos específicos a través de residuos de Lisina. La ubiquitina es activada por la enzima activadora de ubiquitina (E1) dependiente de ATP, y E1 transfiere la ubiquitina a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2). La ubiquitina ligasa E3 recluta al sustrato y a la E2 para realizar la transferencia de E2 al sustrato. La formación de una cadena de poli-ubiquitinas mediada por ciclos repetitivos en la Lisina<sup>48</sup> es la principal señal para la degradación por proteasoma. Los sustratos dirigidos al proteasoma son degradados en péptidos cortos, hidrolizados a aminoácidos por aminopeptidasas. Las moléculas de ubiquitina son retiradas del sustrato por enzimas desubiquitinantes (DUB) del proteasoma antes de la degradación para ser empleadas en otro ciclo de ubiquitinación (Rousseau y Bertolotti, 2018).

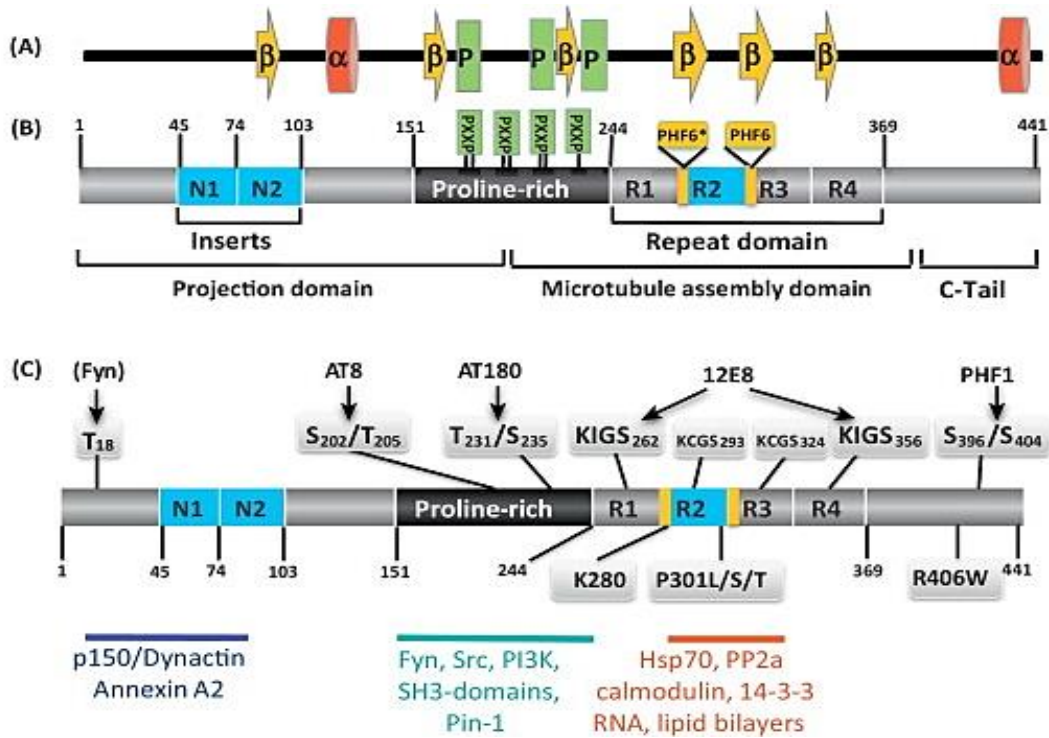
La autofagia desempeña una función importante en el metabolismo del péptido A $\beta$ , facilitando la degradación y eliminación de la A $\beta$ PP y de los productos de su escisión como el fragmento A $\beta$ PP-CTF; además, está involucrada en la secreción de A $\beta$  (Cavieres et al., 2015; Nilsson et al., 2013). Por otra parte, la proteína tau hiperfosforilada colocaliza con vesículas positivas para LC3 y p62 en pacientes con la EA, interrumpiendo el transporte de vesículas axonales al alterar el complejo dineína-dinactina por el aumento de autofagosomas y la toxicidad inducida por su acumulación. En modelos de ratón con la EA, la proteína tau se une a las membranas lisosomales afectando su permeabilidad e integridad, elevando los niveles de LAMP1 y catepsina D (Butzlaff et al., 2015; Collin et al., 2014).

En la autofagia mediada por chaperonas, las cargas específicas se entregan a la superficie lisosomal sin formación de vesículas intermedias, y los sustratos deben contener motivos de reconocimiento KFERQ reconocidos por la chaperona HSPA8 (HSP70), que en conjunto con otras chaperonas transportan el complejo cargo-HSPA8 a la membrana lisosomal donde interactúan con la proteína transmembranal lisosomal LAMP2A quien tras su interacción con el complejo experimenta oligomerización para formar un poro que permite el despliegue del sustrato a la luz del lisosoma en donde será degradado (Figura 7). Esta forma de autofagia se encuentra disminuida en modelos animales de forma dependiente de la edad, y estudios recientes han mostrado que la mejoría de la CMA en modelos murinos con la EA induce una recuperación (Cuervo y Wong, 2014).

#### **4.1.2.2. Cinasas en la EA e hiperfosforilación de la proteína tau**

La fosforilación de la proteína tau está regulada por un equilibrio entre las actividades de las cinasas y las fosfatasas de tau. Esta proteína se asocia a los microtúbulos y se expresa principalmente en las neuronas donde tiene una función crucial en la estabilización del citoesqueleto. La estructura de la proteína tau se divide en 4 regiones: a) una región ácida en la parte N-terminal; b) una región rica en residuos de Prolina; c) una región de unión a microtúbulos

con 4 dominios repetidos R1, R2, R3 y R4, cada motivo con un motivo conservado KXGS que puede fosforilarse en el residuo de Serina ocasionando la desestabilización de los microtúbulos; y, d) una región C-terminal (Figura 11) (Wang y Mandelkow, 2016).



**Figura 11. Estructura, isoformas, dominios, modificaciones e interacciones de la proteína tau.** A) La proteína tau posee pocos elementos de estructura secundaria transitorios  $\alpha$ -hélice (rojo), cadenas- $\beta$  (amarillo) y hélices poliprolina (verde). B) El dominio de proyección de tau (mitad N-terminal) se proyecta alejado de los microtúbulos y puede interactuar con estructuras asociadas a la membrana o proteínas motoras, el dominio de ensamblaje (mitad C-terminal) contiene el dominio repetido y los dominios ricos en Prolinas adyacentes que promueven la unión a microtúbulos; las isoformas de la proteína tau se distinguen por la presencia o ausencia de los insertos N1 y N2 terminales y por el dominio repetido R2 (azul). C) Principales sitios de fosforilación de la proteína tau presentes en la EA y reconocidos por anticuerpos de diagnóstico. La proteína tiene 85 sitios potenciales de fosforilación. Los residuos Tirocina<sup>18</sup> o Tirocina<sup>394</sup> pueden ser fosforilados por Fyn y otras cinasas Src; los epítopos AT8 y AT180 principalmente por GSK3 $\beta$ , MAPKs y CDK5; el epítipo 12E8 principalmente por MARK y SADK; y el epítipo PHF1 por GSK3 $\beta$  (Zempel y Mandelkow, 2014).

Entre los 85 sitios de fosforilación de tau, 28 están fosforilados exclusivamente en el cerebro de pacientes con la EA; 16 están fosforilados tanto en cerebros controles como en la EA; 31 en condiciones fisiológicas, y 10 son sitios de fosforilación putativos (Simic et al., 2016). El cerebro normal contiene de 2 a 3 moles de fosfato por mol de proteína tau, debido a las fosforilaciones en residuos de Treonina y Serina, mientras que la fosforilación de la proteína tau aislada del cerebro de pacientes con la EA muestra un aumento de 3-4 veces (Gong y Iqbal, 2008). La hiperfosforilación de la proteína tau induce la interrupción de las funciones celulares dependientes de esta proteína, incluido el crecimiento axonal, el transporte de vesículas y organelos, y la propagación de señales nerviosas (Alonso et al., 2018).

Las cinasas involucradas en la fosforilación de la proteína tau se agrupan en 3 clases: cinasas dirigidas a Prolina (PDPK), cinasas no PDPK y cinasas de Tirosina (TPK). La regulación de la actividad de estas cinasas ocurre mediante modificaciones postraduccionales como fosforilación e interacción de las subunidades catalíticas con otras moléculas y otras subunidades de cinasas, modificando la especificidad y la distribución intracelular de las cinasas y generando diferentes efectos. GSK3, CDK5, p38, ERK-1/2 y c-Jun son cinasas de residuos de Serina y Treonina que preceden a un residuo de Prolina (Martin et al., 2013).

GSK3 participa en el metabolismo del glucógeno y presenta 2 isoformas,  $\alpha$  y  $\beta$ . La fosforilación en la Serina<sup>21</sup> de la isoforma GSK3 $\alpha$ , y en los residuos Serina<sup>9</sup> y Serina<sup>389</sup> de la isoforma GSK3 $\beta$  inhibe su actividad, mientras que la fosforilación en la Tirosina<sup>279</sup> en la GSK3 $\alpha$  y en la Tirosina<sup>216</sup> de la GSK3 $\beta$  aumenta la actividad de la cinasa. GSK3 es capaz de fosforilar a la proteína tau en 42 sitios, y 29 de estas posibles fosforilaciones se detectan en cerebros de pacientes con la EA (Toral-Rios et al., 2020). La sobre-expresión de GSK3 $\beta$  induce hiperfosforilación de tau y muerte celular, y el incremento en la concentración del péptido A $\beta$  conduce a un aumento de GSK3 $\beta$  (Lauretti et al., 2020; Sergeant et al., 2008). Una mayor actividad de GSK3 $\beta$  ha sido

relacionada con la neurodegeneración del hipocampo, el déficit de memoria, la respuesta inflamatoria, el aumento de la producción de A $\beta$  y la reducción en la síntesis de acetilcolina (Gomez-Sintes et al., 2011).

CDK5 funciona junto a su coactivador denominado p39/p35, ambas isoformas expresadas en sistema nervioso, p39 se expresa fetalmente y disminuye gradualmente cuando aumenta la expresión de p35 a lo largo de la vida, y p29/p25 derivan del procesamiento proteolítico de p39/p35 confiriendo mayor estabilidad y actividad al complejo formado con CDK5. La actividad de CDK5 es esencial para el desarrollo del SNC, regulando la dinámica del citoesqueleto, el crecimiento neurítico, el transporte vesicular y diversas funciones sinápticas. La regulación de la actividad de CDK5 ocurre por fosforilaciones inhibitorias en los residuos Treonina<sup>14</sup> y Serina<sup>159</sup>, así como por la fosforilación en la Tirosina<sup>15</sup> que activa a la cinasa. Las fosforilaciones de p35 en la Serina<sup>8</sup> y la Treonina<sup>138</sup> por CDK5 inhiben la escisión de p35 a p25 previniendo la formación del complejo hiperactivo CDK5/p25, mientras que el procesamiento proteolítico de p35 y p39 por calpaínas dependientes de calcio generan proteínas p25 y p29 más estables que activan el complejo (Kimura et al., 2014).

CDK5 fosforila 11 sitios de la proteína tau y todos estos sitios se encuentran fosforilados en cerebros de los pacientes con la EA en donde la relación p25/p35 y el complejo hiperactivo CDK5/p25 aumentan; los ratones con mutaciones en CDK5 presentan disminución de la formación de marañas neurofibrilares, y su activación aumenta la formación de marañas neurofibrilares en la corteza y el hipocampo (Castro-Alvarez et al., 2014). Además, CDK5 puede fosforilar a las proteínas neurofilamento, A $\beta$ PP y PS1 promoviendo apoptosis neuronal y su inhibición reduce la toxicidad mediada por A $\beta$  (Martin et al., 2013).

Las cinasas activadas por mitógenos (p38, ERK-1/2 y JNK1/2/3N) están involucradas en la fosforilación anormal de la proteína tau en sitios específicos, y la actividad de estas cinasas se encuentra aumentada en cerebros de

pacientes con la EA (Zhu et al., 2002). Las isoformas ERK-1/2 regulan la división, el crecimiento, y la proliferación celular, así como la muerte celular apoptótica. ERK-1/2 se activan por una doble fosforilación en la Treonina<sup>202</sup> y la Tirosina<sup>204</sup> para ERK-1, y en la Treonina<sup>184</sup> y la Tirosina<sup>186</sup> para ERK-2 (Pearson et al., 2001). Estas isoformas fosforilan 15 sitios de la proteína tau presentes en los cerebros de pacientes con la EA, y la fosforilación anormal de la proteína tau está asociada con un aumento en la actividad de ERK-1/2, cuya actividad es regulada por PS1 y PS2 (Dehvari et al., 2008; Kim et al., 2005; Qi et al., 2016).

El efecto patológico de la proteína tau en la EA puede deberse a la fosforilación de sitios específicos, por lo que se han evaluado diversos sitios de fosforilación que parecen relevantes en la patología de la EA (Tabla 1).

**Tabla 1.** Importancia relativa de los sitios específicos de fosforilación de la proteína tau en la función de las cinasas (Martin et al., 2013).

Localización del aminoácido	Sitios de conformación	Sitio de propil-isomerización	Sitios de disociación (motivo KXGS)			Sitio de escisión
	Ser <sup>202</sup> -Thr <sup>205</sup>	Thr <sup>231</sup>	Ser <sup>262</sup>	Ser <sup>324</sup>	Ser <sup>356</sup>	Ser <sup>422</sup>
CK1/2	2	–	1	–	1	–
GSK3	2	1	1	1	1	1
PKA	2	1	1	1	1	1
p38	2	1	–	–	1	1
ERK-1/2	2	1	–	–	1	1
JNK1/3	2	1	–	–	1	1
CDK5	2	1	–	–	–	–
TTBK1/2	2	–	–	–	–	1
CaMKII	–	–	1	–	1	1
PKC	–	–	1	1	1	–
PhK	–	–	1	–	1	–
MARK1-4	–	–	1	1	1	–
PKN	–	–	–	–	–	–
DYRK1A/2	1	–	–	–	–	–
PKB	–	–	–	–	–	–
c-Abl	–	–	–	–	–	–
SFK	–	–	–	–	–	–

Dado que contribuyen a la disociación de la proteína tau de los microtúbulos, los residuos Serina<sup>262</sup>, Serina<sup>324</sup> y Serina<sup>356</sup>, ubicados en motivos KXGS, son sitios claves involucrados en la EA (Mietelska-Porowska et al., 2014). La fosforilación de la proteína tau en la Treonina<sup>231</sup> ubicada en una región que presenta isomerización de la prolina puede contribuir a la disociación de tau de los microtúbulos y a su agregación (Schwalbe et al., 2015). Las fosforilaciones de la Serina<sup>202</sup> y la Treonina<sup>205</sup> generan una conformación patológica de tau característica de la EA (Jeganathan et al., 2008). Así, es posible plantear que una combinación de varios sitios de fosforilación de la proteína tau está involucrada en el proceso patológico de la EA, provocando la disociación de tau de los microtúbulos y promoviendo su agregación.

#### **4.1.2.3. Toxicidad del péptido Amiloide $\beta$ en la EA**

Las placas neuríticas compuestas de agregados del péptido A $\beta$  y las formas solubles del péptido presentan propiedades nocivas para las neuronas, al inducir la formación de poros que permiten el influjo y el eflujo de iones, alteraciones en la dinámica del calcio celular, activación o inhibición de receptores y canales de membrana, y la pérdida del potencial de membrana. Mediante estos efectos pueden promover la apoptosis, la pérdida de sinapsis y alteraciones en el citoesqueleto, así como la interrupción de la plasticidad sináptica (como la inhibición de la potenciación a largo plazo en el hipocampo) y un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (Carrillo-Mora et al., 2014).

Los monómeros de A $\beta$  se derivan del procesamiento de la A $\beta$ PP, siendo dos especies las predominantes, A $\beta$ 2 y A $\beta$ 40, y esta última la forma más abundante. El proceso de fibrillogénesis inicia con monómeros de amiloide que se ensamblan para formar una variedad de especies oligoméricas que se agregan para dar lugar a protofibrillas cortas, flexibles e irregulares que finalmente se alargan en fibrillas insolubles volviéndose resistentes a la escisión proteolítica (Chen et al., 2017).



Aunque en concentraciones fisiológicas el A $\beta$  monomérico no parece ser tóxico, múltiples líneas de evidencia apuntan a los oligómeros de bajo peso molecular, en lugar de las fibrillas, como los principales agentes neurotóxicos en la EA. La gravedad de la enfermedad se ha correlacionado con el A $\beta$  soluble pero no con los agregados, en una etapa intermedia en la formación del amiloide fibrilar maduro. Las formas disociadas o en pequeños agregados oligoméricos de A $\beta$  en pesos moleculares de 7 a 80 kDa son más citotóxicas que sus formas de alto peso en el cerebro del ratón (Sengupta et al., 2016; T. Yang et al., 2017), y una explicación de la toxicidad de los oligómeros se centra en los aminoácidos hidrófobos que quedan expuestos en el amiloide fibrilar (Soto et al., 2007).

Los mecanismos de toxicidad del péptido A $\beta$  pueden involucrar interacciones en la membrana plasmática con canales o poros, conduciendo por ejemplo a la activación de canales de calcio como el receptor a glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), o el adelgazamiento de la membrana, exhibiendo propiedades similares a un detergente (Mroczko et al., 2018). Uno de los mecanismos propuestos para la toxicidad del péptido A $\beta$  es la interrupción de la homeostasis iónica que conduce a un influjo de calcio y desregulación de la concentración de calcio citoplásmico causando disfunción mitocondrial, que a su vez puede conducir a una cascada de ROS (especies reactivas de oxígeno) que llevaría a la apoptosis y a la muerte neuronal (Abramov et al., 2004; Cascella y Cecchi, 2021; Itkin et al., 2011).

La EA se caracteriza por la pérdida de sinapsis siendo una de las correlaciones patológicas más fuertes del deterioro cognitivo. Este evento temprano de la EA se debe a una disfunción sináptica más que a la pérdida neuronal, debida al menos inicialmente al A $\beta$  al inducir alteraciones morfológicas y funcionales en la sinapsis y la plasticidad sináptica (Knobloch y Mansuy, 2008). Se ha reportado que los oligómeros de A $\beta$  pueden actuar como ligandos de receptores de superficie postsinápticos como los de glutamato, nicotínicos, colinérgicos, priónicos y el receptor de Wnt Frizzled, generando vías de

señalización río abajo que conducen al deterioro y la pérdida sináptica. Además, el A $\beta$  afecta la endocitosis y el tráfico de los receptores a glutamato AMPA y NMDA, reduce la densidad de las espinas dendríticas y la proporción de espinas maduras (Reiss et al., 2018).

Por otro lado, la disfunción mitocondrial ocurre en la patogenia temprana de la EA mediada por el depósito de placas neuríticas ocasionando la presencia de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidante, que conllevan a las alteraciones de la función mitocondrial (Reddy y Beal, 2008). El A $\beta$  puede penetrar la membrana mitocondrial interrumpiendo los procesos bioenergéticos a través de la interferencia de la cadena de electrones, mediante la disminución de la actividad de la Citocromo C Oxidasa y de la deshidrogenasa de  $\alpha$ -Cetoglutarato (Hernandez-Zimbron et al., 2012; Tretter y Adam-Vizi, 2005). Así mismo, la producción de A $\beta$  participa en la lipoperoxidación de la membrana celular en modelos murinos de la EA induciendo señalización apoptótica (Butterfield y Lauderback, 2002).

#### **4.1.2.4. Estrés celular y proteínas de choque térmico en la EA**

Las proteínas de choque térmico (HSP) son familias de chaperonas moleculares que desempeñan funciones homeostáticas en el sistema nervioso central al prevenir el plegamiento incorrecto de las proteínas; promueven la degradación de proteínas mal plegadas y protegen de los eventos apoptóticos, el daño inflamatorio, la hipertermia, la hipoxia y el estrés oxidante. En condiciones de estrés las HSP se regulan a la alza para proteger a las células del daño, pero en condiciones como el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas se pueden acumular (Leak, 2014).

Considerando que la principal causa del daño neuronal en la EA se debe al estrés inducido por plegamiento inadecuado de los péptidos A $\beta$  y la proteína tau, mediado por la sobreproducción de oligómeros tóxicos, placas neuríticas y las marañas neurofibrilares, las chaperonas tienen una participación relevante en las enfermedades neurodegenerativas como la EA (Lindberg et al., 2015).

Las HSP se clasifican en los siguientes grupos: HSPH (Hsp110), HSPC (HSP90), HSPA (Hsp70), DNAJ (HSP40), HSPB (HSP pequeñas) y las familias de chaperoninas HSPD/E (Hsp60/Hsp10) y CCT (TRIC). La familia HSPA/HSP70 se caracteriza por una expresión constitutiva y altamente inducible por estrés, sus miembros dependen de ATP y se unen a sustratos proteicos mal plegados, cumplen funciones en la síntesis y plegamiento de proteínas recién sintetizadas, seguido de su transporte al citoplasma a través de la membrana del retículo endoplásmico y son los principales identificadores y reguladores de la respuesta proteica al mal plegamiento (UPR). La familia HSPC/HSP90 está conformada por proteínas abundantes en las células (1-2% del contenido total), dependen de ATP, son inducibles por calor, y son esenciales para la activación y estabilización de varias proteínas sustrato involucradas en eventos de señalización celular, como los receptores a esteroides, cinasas de proteínas y la proteína p53 (Kampinga et al., 2009).

Los análisis proteómicos del hipocampo de ratones transgénicos para A $\beta$ PP presentaron abundantes oligómeros de A $\beta$  mostraron niveles alterados de HSP60, HSP70 y HSP90, con los niveles de A $\beta$  probablemente contribuyendo a la expresión de las chaperonas (Claudia Campanella et al., 2018). HSP70 está involucrada en la neurodegeneración, y en el cerebro de los ratones transgénicos afectados por la EA un aumento en los niveles de HSP70 se ha asociado con efectos neuroprotectores, inhibiendo la agregación del péptido A $\beta$ , ya que HSP70 permite la degradación de oligómeros de A $\beta$  y la proteína tau mediante el sistema de la Ubiquitina-proteasoma (Maiti et al., 2014). HSP90 se asocia a proteínas involucradas en la transducción de señales como cinasas, lo que ocasiona su inactivación reversible. Se ha mostrado que HSP90 inhibe la agregación de A $\beta$ , y su inhibición farmacológica reduce significativamente los niveles intracelulares de la proteína tau fosforilada y la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  (Blair et al., 2014).

El equilibrio entre los niveles de HSP70 y HSP90 representa un área importante de investigación ya que tanto la regulación positiva de HSP70 como la inhibición de HSP90 reducen la agregación de proteínas y la citotoxicidad.

#### **4.1.3. Modelos de estudio de la EA**

No existe un modelo biológico que recapitule todos los aspectos de la EA. Los ratones transgénicos que ofrecen reproducciones robustas y relativamente fieles de un subconjunto de las características de la EA, proporcionando información para la búsqueda de blancos terapéuticos y de la eficacia de terapias farmacológicas; sin embargo, la EA es una enfermedad propia y exclusiva del ser humano.

Se han implementado modelos que van de invertebrados a mamíferos roedores, células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) generadas de células somáticas de pacientes con la EA como los fibroblastos, y modelos computacionales (Saraceno et al., 2013). La generación de modelos que reproduzcan todas las etapas de la progresión de la EA y las vías de neurodegeneración involucradas en la patogénesis sigue siendo necesario. El uso complementario de varios modelos, con ventajas y desventajas diferentes, permitirá comprender las bases moleculares de la EA y el desarrollo de nuevas estrategias para su prevención y tratamiento.

Algunos modelos recientes son capaces de mimetizar el microambiente y el metabolismo celular humano. La rata, el ratón, el perro, el mono y distintos primates han sido empleados para el modelado de enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, están limitados por la variabilidad genética responsable de las funciones biológicas, en comparación con el ser humano (Drummond y Wisniewski, 2017).

Aún no existe método de diagnóstico definitivo de la EA durante la vida del paciente, y la única forma de identificación es la detección de las lesiones cerebrales (placas amiloideas y marañas neurofibrilares) en una muestra cerebral *post-mortem*. Los actuales métodos de diagnóstico comprenden

pruebas neuropsiquiátricas, de neuroimagen, y de exclusión de otras demencias, así como la presencia de proteínas en el plasma y el líquido cefalorraquídeo, las cuales varían de paciente a paciente dado que la sensibilidad en el inicio de la EA no es constante (Turner et al., 2020). Así, la identificación de biomarcadores que permitan predecir de manera temprana el daño cerebral ocasionado por la EA es sumamente importante para la prevención del desarrollo de la enfermedad y su terapéutica.

Diferentes estudios sobre la EA han mostrado que existen afecciones moleculares a nivel periférico y que estos cambios concuerdan con los observados a nivel de sistema nervioso central, como los reportados en fibroblastos de piel, linfocitos, células mesenquimales, plaquetas y fluidos corporales como plasma y líquido cefalorraquídeo (Delbarba et al., 2016; François et al., 2014; Khan y Alkon, 2015; Trushina, 2019). Los fibroblastos de pacientes con la EA de tipo familiar han mostrado elevación de A $\beta$ 42 y deficiencia de la degradación por la vía autofágica, correlacionando con anomalías lisosómicas, acumulación disfuncional de mitocondrias, así como errores en el metabolismo y procesos energéticos, estructurales y de transducción de señales, fenómenos confirmados y exacerbados en células nerviosas derivadas de la reprogramación de células pluripotentes inducidas (Martin-Maestro et al., 2017). Lo anterior muestra que los fibroblastos permiten recapitular mecanismos patológicos similares a los que existen en modelos neuronales que han experimentado reprogramación celular. Por lo tanto, el estudio de células periféricas permitiría la identificación de biomarcadores para el diagnóstico, así como de blancos terapéuticos para la EA.

Los estudios de análisis de expresión de muestras cerebrales y células periféricas, como los fibroblastos de pacientes con la EA de tipo familiar, basados en RNA-seq o análisis proteómico han evidenciado diferencias en los perfiles génicos y proteicos de individuos sanos y afectados con la EA, mostrando cambios tanto aumento como disminución de moléculas

involucradas en diferentes procesos celulares (Magini et al., 2010; Moradifard et al., 2018; Mukhamedyarov et al., 2016).

Actualmente los modelos neuronales derivados de iPSCs obtenidas de células somáticas de pacientes con la EA han proporcionado información en relación con la producción, secreción y oligomerización de A $\beta$ 42 y la respuesta a inhibidores del complejo  $\gamma$ -secretasa, así como de cambios en la fosforilación de la proteína tau, la cinasa GSK-3 $\beta$  y el estrés reticular (Yang et al., 2016), mostrando características patogénicas propias de la enfermedad y proporcionando un modelo promisorio de la misma que puede ser exitoso para la comprensión de la patogénesis.

#### **4.1.3.1. Modelos de células somáticas (fibroblastos) en la EA**

Se han estudiado diversas células no cerebrales para abordar las relaciones causa-efecto en células con los antecedentes genéticos del paciente, como los glóbulos rojos, los linfoblastos y los fibroblastos, revelando diferencias entre controles y pacientes con la EA (François et al., 2014; Trushina, 2019). Los fibroblastos aislados de pacientes presentan ventajas al estar fácilmente disponibles y ser células no transformadas que pueden mantenerse en cultivo, poseen los antecedentes genéticos del paciente lo que se refleja en la expresión proteica. Cualquier cambio en las células periféricas es una propiedad inherente de las mismas y no es secundario a la neurodegeneración (Ambrosi et al., 2014; Auburger et al., 2012; Bahmad et al., 2017; Beh et al., 2020).

Entre los procesos metabólicos modificados en los fibroblastos de pacientes con la EA se han documentado que la oxidación de la glucosa, la producción de lactato y el metabolismo de los carbohidratos son anormales. La dinámica del calcio es el cambio más estudiado y reproducible, siendo su captura uno de los más notables. Las reservas internas de calcio, tanto mitocondriales como del retículo endoplásmico, difieren entre los pacientes y los individuos controles. Las reservas de calcio, evaluadas por la liberación del retículo endoplásmico inducida por bradicinina, se encuentran aumentadas en los

fibroblastos de pacientes con la EA, y este efecto parece relacionarse con cambios en las reservas capacitivas de calcio y con la reducción del flujo de calcio en los fibroblastos. El estudio de los fibroblastos de individuos con la EA, incluidas las formas esporádicas y debidas a mutaciones en la PS1 y la A $\beta$ PP, y células transfectadas (neuronas y fibroblastos) con mutantes de la PS1 ha permitido evaluar el aumento de calcio inducido por la exposición a bombesina o bradicinina (Gasparini et al., 1998; Ito et al., 1994; Jong et al., 2002).

El estrés oxidante varía en los individuos afectados con la EA. El dimetilsulfóxido (DMSO) redujo los niveles de ROS inducidos por peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en los fibroblastos controles, pero el tratamiento con Trolox o Ginkgo biloba redujo las ROS de los fibroblastos con mutaciones en la PS1, indicando que las células periféricas de los pacientes con la EA tienen propiedades inherentes que no son secundarias a los procesos neurodegenerativos y que pueden iniciar o promover la neurodegeneración (Gibson y Huang, 2002; Gibson et al., 2000).

La actividad metabólica del cerebro depende del consumo de glucosa, por lo que la disminución de las actividades de la Piruvato Deshidrogenasa, del Complejo Enzimático Deshidrogenasa de  $\alpha$ -Cetoglutarato (KGDHC) y de la Transcetolasa, produce déficits en la memoria (Bubber et al., 2004). Este complejo multi-enzimático se encuentra constituido por tres componentes E1k, E2k y E3. La reducción de KGDHC ocurre en formas genéticas y esporádicas de la EA, y las formas genéticas de la patología con mutación en A $\beta$ PP670/671 presentan disminución de las proteínas E1k y E2k (Gibson, 2002). Cuarenta líneas fibroblásticas de la EA esporádica presentaron una reducción del 50% en la actividad de la KGDHC y los fibroblastos con mutaciones en la PS1 son más sensibles al estrés oxidante que los controles (GIBSON et al., 1999). Además, algunos estudios indican que la exacerbación de las reservas de calcio induce la sobre-activación de las cinasas ERK-1/2 en fibroblastos de pacientes con la EA (Zhao et al., 2002).

Existe evidencia que los cerebros de pacientes con la EA presentan un metabolismo reducido y experimentan altos niveles de estrés oxidante. Los cultivos de células neuronales sugieren que el estrés puede causar alteraciones relacionadas con la EA, en la transducción de señales, el metabolismo y los sistemas antioxidantes.

#### **4.1.3.2. Células precursoras neurales diferenciadas a partir de iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes con la EA.**

Los estudios con modelos neuronales derivados de iPSCs permitieron evaluar si estos modelos recapitulaban los hallazgos descritos en muestras post-mortem de cerebros de pacientes con EA y roedores, evidenciaron que estas neuronas, de manera similar a los otros modelos, presentan compromiso en la función neuronal y la supervivencia en respuesta al tratamiento exógeno con A $\beta$ . Además, las células precursoras neurales derivadas tanto de pacientes con EA esporádica y familiar exhiben una alta producción y relación A $\beta$ 42/A $\beta$ 40, así como una mayor fosforilación de la proteína tau (Penney et al., 2020).

Las mutaciones de la EA familiar se han modelado en neuronas glutamatérgicas derivadas de iPSCs, evidenciando una variedad de fenotipos. Las neuronas isogénicas con las mutaciones PS1- $\Delta$ E9 y PS1-null mostraron ganancia de función de la  $\gamma$ -secretasa sin pérdida de otras funciones, mientras que las neuronas con las mutaciones PS1-A246E, PS1-V89L y PS1-L105P, al igual que las neuronas de pacientes con EA esporádica, presentaron mayor sensibilidad a la toxicidad mediada por el A $\beta$  y al estrés oxidante comparado con las células de los individuos controles (A. Ochalek et al., 2017; Woodruff et al., 2013). De manera consistente, los fibroblastos y las neuronas de pacientes con la EA muestran defectos en el tráfico celular y las vías de degradación proteasómica y endolisosomal, así como en la mitofagia (Reddy et al., 2016). Las neuronas con alteraciones en las presenilinas exhiben autofagia reducida, niveles alterados del calcio citosólico y nuclear, mayores niveles de especies reactivas de oxígeno y alteraciones en la composición de



la membrana mitocondrial, la estructura y la localización subcelular. Las neuronas derivadas de pacientes con EA esporádica muestran niveles altos de proteínas de los complejos de la cadena respiratoria sin alteraciones en la concentración del péptido A $\beta$  o en la fosforilación de la proteína tau indicando un evento previo a la formación de placas neuríticas y marañas neurofibrilares (Caiazzo et al., 2015).

Las NPCs con las mutaciones PS1-Ser169del y PS1-A246E exhibieron diferenciación acelerada hacia el fenotipo glutamatérgico y las neuronas colinérgicas con la mutación PS1-N141I presentan excitabilidad disminuida e influjo de calcio alterado en respuesta a la insulina en comparación con los controles isogénicos indicando un defecto funcional en los pacientes con la EA (J. Yang et al., 2017).

Las neuronas de pacientes con EA esporádica presentan niveles elevados de A $\beta$  y de fosforilaciones patológicas de la proteína tau, así como endosomas agrandados, disfunción mitocondrial, activación de la respuesta a estrés, sensibilidad al estrés oxidante y daño elevado al DNA (Israel et al., 2012; A. Ochalek et al., 2017). Las neuronas derivadas de iPSCs con presencia del alelo APOE4 producen más A $\beta$  y tienen niveles altos de tau fosforilada en comparación con neuronas portadoras de APOE3, y además presentan alteraciones endosomales, defectos en la autofagia, la mitofagia y modificaciones en la estructura y función sinápticas (Wang et al., 2018). Las NPCs tratadas con A $\beta$  mostraron disminución del número de vesículas de la poza de reciclaje sináptico sin afectar la liberación, y no mostraron efectos presinápticos, pero sí alteraciones de la post-sinapsis como reducción de contactos post-sinápticos, de las corrientes post-sinápticas excitatorias y de la cantidad de receptores AMPA (Nieweg et al., 2015). Las neuronas colinérgicas exhibieron señalización alterada de calcio y mayor sensibilidad a la toxicidad del glutamato (Moreno et al., 2018; Ortiz-Virumbrales et al., 2017).

Los modelos neuronales basados en iPSCs han permitido comprender los eventos tempranos en la EA y los efectos moleculares de las mutaciones

asociadas a la EA familiar y a las variantes esporádicas; estos modelos ofrecen la identificación de mecanismos moleculares subyacentes para la elucidación de los mecanismos patogénicos, así como para el desarrollo de formas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

#### **4.1.4. Proteómica en la Enfermedad de Alzheimer**

El análisis proteómico basado en espectrometría de masas (MS) generalmente consta de tres pasos principales: el procesamiento de la muestra, la adquisición de datos mediante la MS, y la bioinformática posterior a la MS. En la proteómica descendente los péptidos digeridos se separan mediante cromatografía líquida (LC), se ionizan mediante electropulverización y se analizan mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS o MS<sup>2</sup>). Este proceso de separación permite la selección de un solo péptido de entre otros péptidos co-eluidos en función de la relación masa-carga ( $m/z$ ) (Aslam et al., 2017; Chen et al., 2020; Karpievitch et al., 2010).

Diversos estudios han intentado caracterizar los cambios proteómicos completos en el cerebro de los pacientes con la EA, empleando geles 2-DE o cromatografía líquida seguidos de MS o directamente en sistemas de MS capaces de resolver iones. En estudios con más de 2000 cerebros se han perfilado diferencias en módulos de proteínas involucrados en la sinapsis, la función mitocondrial, el metabolismo de la glucosa, la matriz extracelular, el citoesqueleto y la unión/empalme del RNA (Bai et al., 2021). Dados los perfiles génicos del tipo de célula, se han identificado 638 proteínas específicas basadas en el tipo celular, incluidas 140 en los astrocitos, 337 en neuronas, 10 en oligodendrocitos, 118 en la microglía y 33 en endotelios, apoyando la idea de la contribución de diversos tipos celulares a la patogénesis de la EA (Zhang et al., 2016).

El líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma, células periféricas, saliva, orina o tejido cerebral son muestras biológicas utilizadas para el análisis proteómico en la búsqueda de biomarcadores y potenciales ensayos clínicos futuros. El LCR refleja el 20% de las proteínas a nivel cerebral y en el mismo se han

identificado 3081 proteínas incluidas 520 glicoproteínas (Guldbrandsen et al., 2014; Wesseling et al., 2020). Al compararse el LCR de pacientes con la EA con el de individuos sanos se han identificado alteraciones en los niveles del péptido A $\beta$  y de las formas fosforiladas de la proteína tau, y estas relaciones cuantitativas derivadas del análisis proteómico se han denominado “Perfiles de Alzheimer en LCR” y han sido recomendadas por diversos autores para el diagnóstico y pronóstico de la EA (Bader et al., 2020; Olsson et al., 2016).

Los análisis proteómicos de marcadores distintos al péptido A $\beta$  y a la proteína tau derivado de muestras de LCR, identificaron a YKL-40, una glicoproteína con actividad de quitinasa asociada a procesos inflamatorios producida por neutrófilos, macrófagos, condrocitos y fibroblastos. Así mismo, la ubiquitinación de A $\beta$  y la proteína tau en los agregados proteicos puede reflejar deterioro en la vía de degradación proteasomal (Heywood et al., 2015).

La identificación mediante proteómica-redox de proteínas modificadas por oxidación o nitración en muestras cerebrales de pacientes con la EA, en etapas tardías, ha mostrado que diversas proteínas glucolíticas ( $\alpha$ -Enolasa, Aldolasa, GAPDH, Piruvato Cinasa, Lactato deshidrogenasa, Aconitasa, Malato deshidrogenasa y ATP sintasa), del ciclo de ácidos tricarboxílicos y proteínas relacionadas con la vía mitocondrial (HSP70, Ubiquitina c-terminal, Hidrolasa L1 y VDAC-1) son disfuncionales como consecuencia de modificaciones oxidativas, con la consiguiente disminución en la producción de ATP, lo que conduce a la pérdida del potencial de membrana, con la consecuente apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, repercutiendo en la disfunción del retículo endoplásmico, inflamación mitocondrial, la liberación del citocromo C y el inicio de la vía intrínseca de la apoptosis (Butterfield y Boyd-Kimball, 2019).

Los análisis proteómicos de cerebros de sujetos con mutaciones en el gen de PS1, identificaron a la  $\gamma$ -Enolasa neuronal específica, Actina, UCHL-1 y Dimetilarginina dimetilamina hidrolasa (DMDAH), asociadas con la función de

especies reactivas que se encuentran en el cerebro de los pacientes con la EA (Butterfield et al., 2006).

En el hipocampo de ratones con la mutación A $\beta$ PPE693 $\Delta$ , los cuales poseían abundantes oligómeros del péptido A $\beta$  desde los 8 meses de edad, mediante geles 2-DE y espectrometría de masas en tándem se identificaron 14 proteínas expresadas diferencialmente entre las que se encontraban Actina, HSP70, Enolasa, la subunidad  $\beta$  de la ATP-sintasa, Clatrina, Dinamina-1, Neurofilamento, Fosfoproteína 1 inducida por estrés, HSP60, Internexina, PKC, y Pacsina-1, evidenciando cambios en la expresión de las chaperonas, disfunción neural, alteraciones en las proteínas asociadas al metabolismo energético y modificaciones en la formación y exocitosis de las vesículas sinápticas (Takano et al., 2013). Mediante geles 2-DE y MS se evidenció que los fibroblastos de biopsias de piel de pacientes con mutaciones en PS1 (L392V y M146L) presentan perfiles proteicos únicos respecto a los individuos controles; se identificó la expresión diferencial de cuatro proteínas asociadas con la adhesión celular, el citoesqueleto y la motilidad (TPM4, CapG, LGALS1, S100A10), cuatro proteínas (PHB, PGAM1, Eno1 y AKR1A1) reguladas a la baja y relacionadas con el metabolismo de la glucosa, cuatro proteínas de respuesta a estrés celular y de la vía ubiquitina-proteasoma reguladas a la baja (UCH-L1, Ub, HSPA5 y PPIA), y dos proteínas reguladas a la alta (SH3BGRL y SH3BGRL) relacionadas con la transducción de señales (Magini et al., 2010).

#### **4.1.5. RNA-seq en la Enfermedad de Alzheimer**

La expresión diferencial de genes ha sido objetivo en el descubrimiento de las vías moleculares afectadas en enfermedades neurodegenerativas, con base en el aumento o disminución de la expresión de dichos genes en comparación con individuos no afectados con la EA. En la EA la búsqueda de genes expresados diferencialmente no ha sido la excepción, y a la fecha se siguen investigando patrones de expresión génica de diferentes áreas del cerebro y de tejidos no nerviosos, permitiendo evaluar si los cambios transcripcionales

dan lugar a efectos aditivos en los factores de riesgo conocidos para la EA y en las vías relacionadas con la enfermedad.

Se han identificado cambios en la expresión de la Cinasa 2 de caseína (CSNK2B), la Apopliproteína J (APOJ), el Inhibidor de la metaloproteasa 3 (TIMP3), la Cinasa asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK1) y la Calpaína 7 (CAPN7), mediante el análisis de expresión génica de célula única en neuronas afectadas con la EA y controles (Dunckley et al., 2006).

El transcriptoma completo de muestras cerebrales de pacientes con mutación en PS1 evidenció cambios involucrados en mecanismos de la vía de señalización de calcio, la señalización de la proteína tau asociada a microtúbulos y la potenciación a largo plazo (Antonell et al., 2013). Otro estudio centrado en el patrón de expresión de 414 pacientes con EA e individuos no afectados encontró diferentes grupos de genes cuyos niveles de expresión pueden cambiar en la EA, entre los que se encontraron genes relacionados con la transmisión sináptica (NRG1, GABA, LPAR), la reparación y transcripción de DNA (MCM7, TDP1, DEK), la respuesta inmunitaria (TYROBP, CXCR3, SOCS3), y factores metabólicos (DNM1K, HIG1, COX10) identificando cuatro objetivos enriquecidos expresados diferencialmente (SP1, EGR3, TGIF1 y BPTF) (Canchi et al., 2019). Empleando modelos gliales de pacientes con EA otros estudios identificaron asociaciones con el sistema inmune, la señalización del activador de la transcripción de la cinasa Janus (JAK/STAT), la señalización de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPKs) y alteraciones en la expresión de RNA largos no codificantes (Kunkle et al., 2019). En las primeras etapas de la patología, el aumento en la expresión se asoció con genes relacionados con la respuesta al estrés y al mantenimiento de la homeostasis en la gran mayoría de células (Mathys et al., 2019).

El estudio del transcriptoma puede proporcionar marcadores que contribuyan al diagnóstico y el tratamiento de la EA, permitiendo identificar la expresión diferencial de proteínas metaestables que desempeñen funciones críticas en

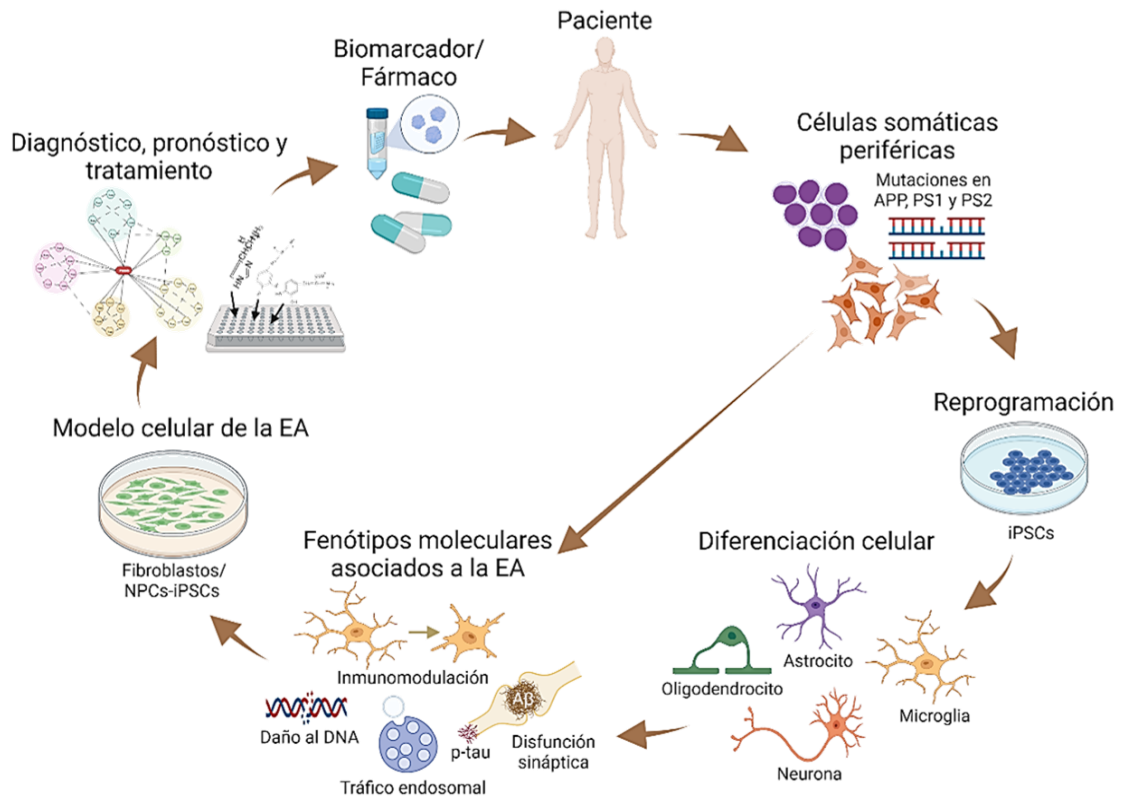
el mantenimiento de la homeostasis, resultando en el depósito del péptido A $\beta$ , y en la hiperfosforilación de la proteína tau.

## 5. Justificación

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno cerebral progresivo e irreversible, caracterizado por la pérdida de la memoria y las habilidades de pensamiento. Hoy día la comprensión de la patogénesis de la EA es aún limitada dada la dificultad para modelar aspectos moleculares exclusivos de una enfermedad del ser humano.

Se ha mostrado que los mecanismos neuronales alterados en la EA, incluidas las vías de transducción de señales, el metabolismo oxidativo, el procesamiento de APP, la vía autofágica-lisosomal, la dinámica y función mitocondrial, la homeostasis del calcio y la inflamación; también se ven afectados en fibroblastos, eritrocitos, plaquetas, orina, plasma y LCR. Por lo anterior, la implementación de fibroblastos de la piel como modelo brinda excelentes oportunidades en la comprensión a nivel molecular de la EA, dado el fondo patogénico de los pacientes y la posibilidad de generar líneas de células neurales específicas de la enfermedad y del paciente mediante procesos de reprogramación celular, permitiendo confirmar y correlacionar cambios a nivel de SNC y células periféricas como los fibroblastos.

Así, los fibroblastos representan una estrategia útil para la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen la enfermedad, así como para la identificación de biomarcadores y blancos terapéuticos que permitan el desarrollo de nuevos fármacos para la EA (Figura 12). La investigación biológica, clínica, traslacional y farmacéutica de las células periféricas como los fibroblastos y el uso de células neurales derivadas de la reprogramación celular es esencial para determinar el potencial de estos modelos en la resolución de problemas de la salud humana como la EA (Wan et al., 2015).



**Figura 12. Estrategia de análisis de modelos celulares derivados de pacientes con la EA.** Las células periféricas derivadas de pacientes con la EA familiar o esporádica, como los fibroblastos y las NPC-iPSCs, representan modelos atractivos que pueden ser empleados en el análisis de fenotipos moleculares asociados a la EA, los cuales pueden evidenciar cambios en las vías moleculares como el tráfico endosomal, el daño al DNA, el estrés oxidante, la disfunción sináptica, el procesamiento de A $\beta$ PP y la hiperfosforilación de la proteína tau, que sirvan para el tamizaje de fármacos o la identificación de biomarcadores que puedan ser implementados en los pacientes en el futuro.



## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivo general**

Determinar si existen diferencias en la expresión de proteínas y genes relacionados a la neurodegeneración en fibroblastos y células precursoras neurales derivadas de iPSCs obtenidas de pacientes con la EA e individuos controles

### **6.2. Objetivos particulares**

1. Caracterizar los fibroblastos de pacientes con la EA y controles mediante inmunodetección de los marcadores Vimentina y S100A4.
2. Identificar mediante análisis *in silico* de tejido cerebral de pacientes con la EA y controles posibles cambios en la expresión de proteínas de señalización neuronales.
3. Evaluar por inmunodetección en los fibroblastos de pacientes afectados con la EA la expresión diferencial de las proteínas identificadas en el análisis *in silico*.
4. Caracterizar mediante la expresión de marcadores neuronales las NPCs-iPSCs y evaluar mediante RNA-seq cambios de expresión génica.

## 7. Metodología

### 7.1 Cultivo celular

#### 7.1.1. Fibroblastos humanos

Los cultivos de fibroblastos de piel fueron obtenidos del repositorio de células Coriell Institute de New Jersey. Las células provienen de pacientes que desarrollaron la EA de tipo familiar que pertenecen a dos familias distintas (Ver anexos), una de origen italiano con la mutación M146L en PS1 y otra canadiense con la mutación A246E en PS1, así como de individuos sanos de las mismas familias (Candem, New Jersey, USA), como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Líneas de fibroblastos de pacientes afectados con la EA familiar y controles

Línea	Identificador	Edad	Sexo	Diagnóstico clínico	Familia
AG07872	EA2	53	HOMBRE	EA FAMILIAR-PS1 (M146L)	Italiana-1079
AG08110	EA1	41	MUJER	EA FAMILIAR-PS1 (M146L)	Italiana-1079
AG08064	EA3	41	HOMBRE	EA FAMILIAR-PS1 (M146L)	Italiana-1079
AG07936	NA1	69	MUJER	CONTROL	Italiana-1079
AG08125	NA2	64	HOMBRE	CONTROL	Italiana-1079
AG08620	NA3	64	MUJER	CONTROL	Italiana-1079
AG07629	EA4	54	HOMBRE	EA FAMILIAR-PS1 (A246E)	Canadiense-964
AG08170	EA5	56	HOMBRE	EA FAMILIAR-PS1 (A246E)	Canadiense-964
AG06840	EA6	56	HOMBRE	EA FAMILIAR-PS1 (A246E)	Canadiense-964
AG07573	NA4	36	HOMBRE	CONTROL	Canadiense-964
AG07619	NA5	68	HOMBRE	CONTROL	Canadiense-964
AG07621	NA6	57	HOMBRE	CONTROL	Canadiense-964

Los fibroblastos se cultivaron en medio esencial mínimo con sales de Earl (Gibco, LifeTechnologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con 15% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) no inactivado (Byproducts, Guadalajara, Jalisco, México), 1% (v:v) de Glutamax (Gibco, LifeTechnologies, Grand Island, NY, USA), 1% (v:v) de una solución de penicilina-estreptomina (Gibco, LifeTechnologies, Grand Island, NY, USA), 1% (v:v) de aminoácidos no esenciales (Invivo, CDMX, México), en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire y a 37 °C. Los cultivos celulares fueron empleados en los pasajes 10 – 20 bajo las mismas condiciones de cultivo, y el medio se cambió cada tercer día hasta alcanzar una confluencia de 90% para realizar los experimentos.

### 7.1.2. Células precursoras neurales (NPCs) derivadas de iPSCs

Se obtuvieron células precursoras neurales derivadas de la diferenciación de células troncales pluripotentes inducidas de pacientes con mutación en la PS1 (EA familiar) e individuos aparentemente sanos (controles), obtenidos de la compañía AXOL (Babraham Research Campus, Cambridge, United Kingdom), como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Líneas de NPCs de pacientes afectados con la EA familiar y controles

Línea	Identificador	Edad	Sexo	Mutación en PS1
ax0112	NPCs-EA2	38	MUJER	L286V
ax0113	NPCs-EA3	53	HOMBRE	M146L
ax0114	NPCs-EA4	45	MUJER	A246E
ax0016	NPCs-NA6	0	MUJER	Ninguna (CONTROL)
ax0018	NPCs-NA8	74	HOMBRE	Ninguna (CONTROL)
ax0019	NPCs-NA9	64	MUJER	Ninguna (CONTROL)

Las células fueron cultivadas en medio de crecimiento para células precursoras neurales constituido por Neurobasal (Invitrogen), B27 (Invitrogen), Glutamax 1% (Gibco), solución de antibiótico-antimicótico 1% (Gibco), glucosa

al 0.01% (Sigma) y factores de crecimiento (EGF 40 ng/ml; bFGF 40 ng/ml; LIF 10 ng/ml), utilizando el sustrato Geltrex (Gibco), diluido 1:100 en medio de crecimiento y colocado sobre cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, e incubando durante 1 h a 37 °C antes de la siembra de las células. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

## **7.2. Cariotipo**

El análisis del cariotipo se realizó con cada una de las líneas de fibroblastos mediante las bandas G. Cuando la confluencia celular alcanzó el 90% en las cajas de 25 cm<sup>2</sup>, el medio de cultivo se reemplazó por medio que contenía colcemida (0.1 µg/mL), se incubó por 20 min en la incubadora de CO<sub>2</sub>, las células se colectaron mediante tripsinización (0.05%) y se suspendieron en 5 ml de solución de KCl 75 mM. La suspensión se incubó a 37°C durante 20 min, se añadió 1 ml de fijador de Carnoy frío (metanol/ácido acético, 3:1) y se mezcló. La suspensión celular se centrifugó a 900 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se colectó la pastilla celular. Después de dos etapas de fijación (adición de 5 ml de fijador y centrifugación a 900 rpm durante 10 min), las células se fijaron mediante suspensión en 200 µl de fijador frío y cada suspensión se dispersó en portaobjetos de vidrio que se hornearon a 75 °C durante 3 h. Se realizó la tinción de Giemsa y se examinaron veinte cariotipos por cada portaobjetos.

## **7.3. Inmunofluorescencia**

Cuando los cultivos de fibroblastos o NPCs-iPSCs alcanzaron el 90% de la confluencia en cajas de 25 cm<sup>2</sup>, las células se levantaron empleando tripsina al 0.05% y se sembraron 200,000 células por pozo en una placa de 24 pozos conteniendo cubreobjetos de 12 mm. Después de 24 h, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados con solución amortiguadora conteniendo glucosa (GBS) 1x. Las células fueron permeabilizadas con 0.25% de Triton-X-100 en GBS 1x por 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con GSB 1x,

y se incubaron en solución de bloqueo (1% w/v de albúmina sérica bovina, BSA, y 0.25% de Tritón-X-100 v/v en GBS 1X) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con anticuerpo primario a la dilución apropiada en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche, se lavó 3 veces por 5 min con GBS 1x, y se incubó con un anticuerpo secundario fluoresceínado diluido en GBS 1x + 1% BSA durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con GBS 1x y posteriormente los núcleos se tiñeron con DAPI (1 µg/ml) durante 10 min y se lavó 3 veces con GBS 1x. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con fluorogel (Electro Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

Los anticuerpos utilizados fueron anti-Vimentina y anti-S100A4 (Tabla 4). Los cubreobjetos montados fueron examinados con un objetivo de inmersión en aceite 40x de un microscopio confocal LEICA SP8. Las imágenes se generaron con el programa LAS X (Leica Systems) versión 3.7.1. y el programa ImageJ (NIH versión 1.52p) con el paquete de procesamiento de imágenes FIJI (Schindelin et al., 2012).

#### **7.4. Análisis *in silico* (GEO2)**

Los datos (*fold change* y *adj.P value*) del análisis de expresión génica realizado por Antonell et al. (Antonell et al., 2013) en 21 muestras de cerebro (a nivel del tálamo) de individuos afectados con la EA y controles (GEO Series accession number GSE39420). se analizaron en el algoritmo GEO2R de la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO). Se compararon los datos de siete individuos control y siete individuos (45-64 años) afectados por la EA familiar con una mutación en la PS1 (cuatro con la mutación M139T, dos con la mutación V89L y uno con la mutación E120G). La distribución de la expresión de los datos de las muestras seleccionadas se determinó mediante el comando *Value distribution*, y los datos de la comparación para la expresión de ~3400 genes entre los grupos de control y los afectados con la EA se exportaron en formato Excel para su posterior análisis y graficación.

## 7.5. Western Blotting

Las 12 líneas celulares de fibroblastos de los pacientes afectados con la EA y controles se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 90%; la caja de cultivo se lavó tres veces con GBS 1x para eliminar proteínas del SFB y posteriormente los fibroblastos se lisaron con solución RIPA (1x PBS, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.24 mg/ml AEBSF, 8 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 4 µg/ml pepstatina, 5 mM benzamidina, 20 mM β-glicerofosfato, 10 mM NAF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA y 1 mM EGTA). El extracto de proteínas se congeló a -20 °C toda la noche y después se centrifugó a 14000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante. La proteína total se cuantificó usando el sistema Pierce BCA Protein Assay Kit® (Thermo Scientific).

Las proteínas fueron separadas en geles de 10%-12% SDS-PAGE y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm. Las membranas fueron bloqueadas en leche libre de grasa (Blotting grade milk, BioRad) al 5% (w/v) en solución TBST (0.05% Tween 20 en solución amortiguadora Tris) a temperatura ambiente por 1 h. Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4 °C toda la noche en solución de bloqueo, las membranas se lavaron tres veces con TBST a temperatura ambiente, y posteriormente fueron incubadas con anticuerpo secundario peroxidado anti-ratón o anti-conejo IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) diluidos en TBST. Después de tres lavados con TBST, las bandas fueron visualizadas con el reactivo de quimioluminiscencia (ECL). Los registros del revelado de las membranas fueron escaneados y analizados utilizando los programas ImageJ-FIJI (NIH versión 1.52p) e ImageLab de Bio Rad (BioRad, Hercules, CA, USA). Los anticuerpos primarios utilizados se enlistan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Anticuerpos usados en inmunofluorescencia y protocolos de western blot

Anticuerpo	Catálogo	Especie	Descripción	Dilución	Compañía
Vimentin	Sc-6260	Rabbit polyclonal	Mesenchymal marker	1/250	Santa Cruz, Dallas, TX, USA.
S100A4	GTX134743	Rabbit polyclonal	Fibroblastic marker	1/250	Genetex, Irvine, CAS, USA.
SQSTM1/p62	BS-2951R-TR	Rabbit polyclonal	Autophagy marker	1/1000	Bioss Antibodies Inc, Woburn, MA, USA.
LC3	GTX17380	Rabbit polyclonal	Autophagy marker	1/1000	Genetex, Irvine, CAS, USA.
LAMP2	ABL-93-S	Rat monoclonal	Lysosomal marker	1/500	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa city, IA, USA.
CatD	GTX62063	Rabbit polyclonal	Lysosomal marker	1/1000	Genetex, Irvine, CAS, USA.
PSMB5	GTX50128	Rabbit polyclonal	Proteasome marker	1/1000	Genetex, Irvine, CAS, USA.
p-AKT Ser473	GTX50128	Rabbit polyclonal	Cell survival marker	1/1000	Genetex, Irvine, CAS, USA.
AKT	2938s	Rabbit polyclonal	Cell survival marker	1/1000	Cell signaling technology, Danvers, MA, USA.
p-GSK3A/B	9327s	Rabbit polyclonal	Kinase marker	1/1000	Cell signaling technology, Danvers, MA, USA.
total GSK3A/B	5676p	Rabbit polyclonal	Kinase marker	1/1000	Cell signaling technology, Danvers, MA, USA.
p-ERK-1/2	4695s	Rabbit polyclonal	Kinase marker	1/1000	Cell signaling technology, Danvers, MA, USA.
Total ERK-1/2	9101s	Rabbit polyclonal	Kinase marker	1/1000	Cell signaling technology, Danvers, MA, USA.
p-tau Thr <sup>231</sup>	MBS9600919	Rabbit polyclonal	tau phosphorylation marker	1/1000	Biosource, San Diego, CA, USA.
p-tau Thr <sup>181</sup>	GTX50171	Rabbit polyclonal	tau phosphorylation marker	1/1000	Genetex, Irvine, CAS, USA.
p-tau Ser <sup>396</sup> /Ser <sup>404</sup> (PHF-1)	ab184951	Rabbit polyclonal	tau phosphorylation marker	1/1000	ABCAM, Cambridge, MA, USA.
p-tau Ser <sup>202</sup> /Ser <sup>205</sup> (AT8)	MN1020	Mouse monoclonal	Tau phosphorylation marker	1/1000	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA.
total tau (tau5)	556319	Rabbit polyclonal	tau phosphorylation marker	1/1000	BD Pharmingen Inc, San Diego, CA, USA.
AβPP (6E10)	SIG-39320	Rabbit polyclonal	tau phosphorylation marker	1/1000	BioLegend, San Diego, CA, USA.
HSP90	K3720A	Mouse monoclonal	Stress cellular marker	1/1000	BioLegend, San Diego, CA, USA.
HSP70	GTX104126	Rabbit polyclonal	Stress cellular marker	1/1000	Genetex, Irvine, CAS, USA.
HSP60	MCA-1C7	Mouse monoclonal	Stress cellular marker	1/1000	EnCor Biotechnology, Gainesville, FL, USA.
βIII-Tubulin	GTX50789	Rabbit polyclonal	Neural stem cell marker	1/250	Genetex, Irvine, CAS, USA.
Nestin	GTX30671	Mouse monoclonal	Neural stem cell marker	1/250	Genetex, Irvine, CAS, USA.
Ki67	GTX16667	Rabbit monoclonal	Cell proliferation	1/250	Genetex, Irvine, CAS, USA.
GAPDH	GTX627408	Mouse monoclonal	Load control	1/1000	Genetex, Irvine, CAS, USA.

## 7.6. Proteómica

### 7.6.1. Extracción de proteínas para electroforesis de geles de 2-DE

Todos los reactivos se adquirieron de Millipore Sigma (St. Louis, MO, USA), a menos que se indique lo contrario. La extracción de proteínas se realizó de acuerdo a los estudios previos de Hajduch et al. (Hajduch et al., 2005) y Herrera-Díaz et al. (Herrera-Díaz et al., 2018), con algunas modificaciones. Se cultivaron dos líneas de fibroblastos controles (NA2 y NA3) y dos líneas de pacientes con la EA (EA1 y EA2) en nueve cajas de cultivo de 300 cm<sup>2</sup> para cada línea celular. Al alcanzar una confluencia del 95%, las células se lavaron tres veces con GBS 1x y se colectaron en 15 ml de la misma solución. La suspensión celular se centrifugó (1000 rpm, 5 min) y la pastilla se suspendió en 10 ml de una mezcla de una solución de fenol al 50% (v/v) y una solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M al 50% (pH 8.8), conteniendo 0.9 M de sacarosa, EDTA 10 mM, 2-betamercaptoetanol al 0.4 % e inhibidores de proteasas (Complete<sup>TM</sup>, Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA).

Las muestras se homogenizaron en un homogeneizador Ultra-turrax T-25 (IKA Works, Wilmington, DE, USA), se mantuvieron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 4000 rpm durante 40 min. Se colectó la fase orgánica, se añadieron 25 ml de acetato de amonio (0.1 M) en metanol al 100% y se dejó reposar la mezcla a -20 °C durante 16 h para la precipitación de las proteínas. Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min y el precipitado se lavó con 5 ml de acetato de amonio 0.1 M en metanol al 100 % (dos veces), acetona 0.1 M al 80 % (dos veces) y etanol al 70 % (una vez). La pastilla se secó a temperatura ambiente y posteriormente se disolvió en 400 µl de solución amortiguadora de isoelectroenfoque (IEF) que contenía tiourea 2 M, urea 8 M, 2% (v/v) Tritón X-100, ditiotretitol (DTT) 0.05 M, 0.4 % (w/v) CHAPS e inhibidores de proteasas (Complete<sup>TM</sup> sin EDTA; Roche Molecular Diagnostics). Después de una resuspensión cuidadosa, la mezcla se centrifugó a 14000 g durante 15 min para obtener un sobrenadante



transparente. La concentración de proteínas se determinó con Nanodrop a 280 nm (Thermo Scientific) y la integridad de las proteínas se analizó mediante SDS-PAGE unidimensional al 12 % y tinción de Coomassie durante al menos 16 h.

### **7.6.2. Geles 2-DE y análisis**

Las proteínas se separaron por electroforesis bidimensional (2-DE) según el método descrito por Herrera-Díaz et al. (Herrera-Díaz et al., 2018) con algunas modificaciones. Se aplicaron 350 µg de proteína total extraída de las cuatro líneas de fibroblastos (NA2, NA3, EA1 y EA2) en una tira de gel de poliacrilamida de 11 cm con un gradiente inmovilizador de pH (IPG BioRad) con rango de pH 3-10 durante 10 min, a temperatura ambiente, en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, BioRad). Posteriormente, las tiras se cubrieron con aceite mineral y la bandeja se transfirió a una unidad de enfoque isoeléctrico PROTEAN i12 IEF Cell (BioRad) para rehidratación activa (12 h, a 20 °C). A la rehidratación le siguieron inmediatamente cinco pasos de enfoque: 500 V durante 30 min (rápido), 1000 V durante 1 h (gradiente), 3000 V durante 1 h (gradiente), 5000 V durante 2 h (gradiente) y 8000 V (rápido) durante 3 h, hasta una tensión acumulada de 30-35 kV.

Después del enfoque isoeléctrico, las tiras de IPG se retiraron de la bandeja y se incubaron con solución amortiguadora de equilibrio SDS (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, urea 6 M, glicerol al 30 % v/v, 5 %, SDS w/v y DTT al 2 %) durante 15 min, con agitación a temperatura ambiente. Este proceso se repitió dos veces y después se incubó con solución amortiguadora de alquilación SDS (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, urea 6 M, 30 % v/v de glicerol, 5 % p/v de SDS y 2.5% de yodoacetamida) durante 15 min, con agitación a temperatura ambiente, repitiéndose el proceso dos veces y finalmente se lavó una vez con solución amortiguadora de corrida SDS-PAGE 1x.

Las tiras lavadas se sometieron a una separación de segunda dimensión en geles desnaturalizantes de acrilamida al 12% en el sistema SE 600 Ruby System (GE Healthcare) a 25 °C con voltaje constante (50 V) durante 22 h a temperatura ambiente. Los geles se fijaron con metanol al 50% durante 30 min y posteriormente se tiñeron con Coomassie Coloidal (20% [v/v] de etanol, 1.6% [v/v] de ácido fosfórico, 8% [w/v] de sulfato de amonio, 0.08% [w/v] Coomassie Brilliant Blue G-250) durante al menos 16 h. Finalmente, los geles se lavaron con agua bidestilada, hasta lograr el contraste adecuado para la identificación de los puntos (*spots*). Los geles 2-DE y las transferencias Western se escanearon con el densitómetro calibrado GS-900 (BioRad). Las imágenes escaneadas de los geles 2-DE se analizaron utilizando el programa SameSpots v5.1.012 (TotalLab, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) en la opción de estudio de análisis diferencial de punto único.

### **7.6.3. Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

Las muestras se procesaron como se describió por Duarte-Escalante et al. (Duarte Escalante et al., 2018) con algunas modificaciones. Los extractos de proteínas totales de los fibroblastos NA2, NA3, EA1 y EA2 se trataron con una solución de DTT 0.05 M como agente reductor. Después de 45 min, se añadió yodoacetamida 0.03 M y la mezcla se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, las muestras se lavaron 3 veces con solución de bicarbonato de amonio 0.1 M y se deshidrataron con acetonitrilo al 100% al vacío. La digestión se realizó mediante la adición de 30 µl de una solución de tripsina porcina modificada (20 ng/µl; Promega, Madison, WI, USA) en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM, seguido de incubación durante 24 h a 37 °C.

Los péptidos resultantes se extrajeron dos veces en acetonitrilo al 50% (v/v) y ácido fórmico al 5% (v/v) durante 30 min con sonicación. El volumen se redujo por evaporación en una centrífuga de vacío y se ajustó a 20 µl con ácido fórmico al 1% (v/v). El análisis espectrométrico de masas se realizó con un sistema integrado *nano-LC-ESI MS/MS quadrupole/time of light, synapt G2*

*high-definition mass spectrometer* (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una fuente de iones *NanoLockSpray*, acoplado en línea a un sistema *UPLC nanoacquity* (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

#### **7.6.4. Procesamiento de datos e identificación de proteínas**

El procesamiento de datos se realizó con el servidor global ProteinLynx versión 2.4 y el software Protein Lynx con servidor global (PLGS; Waters Corporation). Se aceptaron como correctas las puntuaciones de PLGS con una confianza >95%. En la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org>) los péptidos se compararon con los péptidos teóricos de las proteínas reportadas para las muestras.

#### **7.6.5. Análisis bioinformático de perfiles de proteínas obtenidos por espectrometría de masas (bases de datos Panther y String)**

De las listas de proteínas reportadas por análisis de espectrometría de masas se seleccionaron aquellas con un puntaje de probabilidad del 99% de estar presentes en las muestras representadas con un valor "OK" igual a 2. Las proteínas se separaron según su expresión diferencial por células de individuos afectados con la EA o de individuos control, y con la nomenclatura genética de las proteínas, se construyeron interactomas (redes de asociación de proteínas funcionales) utilizando la sección de proteína única por nombre de la base de datos String (<https://string-db.org/>), se seleccionaron grupos de proteínas dada su función celular. Al mismo tiempo, se usó la base de datos Panther (<http://pantherdb.org/>) para la clasificación de ontologías génicas, en la sección Gene List Analysis se analizaron las listas de proteínas de ambos grupos, seleccionando el estudio de clasificación funcional de procesos biológicos y la subclasificación de procesos celulares en la vista de gráfico circular (gráficas de pastel).

### **7.7. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para evaluar las diferencias de expresión entre

los puntos de los geles 2-DE de control y los fibroblastos con la EA familiar detectados con el software SameSpot (v5.1). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar.

Para el análisis que involucró a múltiples grupos, se utilizó ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Fischer, Tukey o Bonferroni (según correspondía). Para todas las demás comparaciones, se utilizó la prueba t de Student. Para todos los efectos, el valor  $p \leq 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

En la sección de resultados, se incluyó el valor cambio de las proteínas expresadas diferencialmente y que presentaron diferencia significativas en los geles 2-DE del grupo control respecto al afectado con la EA, solo para resaltar los hallazgos principales de manera didáctica e ilustrativa, pero todos los análisis estadísticos se indican en las figuras. Además, cada experimento se realizó con un duplicado interno y 3 réplicas experimentales, por lo que cada análisis densitométrico corresponde a todas estas réplicas, lo que valida el análisis estadístico.

## **7.8. RNA-seq**

### **7.8.1. Extracción de RNA y preparación de bibliotecas de transcriptomas a partir Células Precursoras Neurales (NPCs) derivadas de iPSCs de pacientes afectados con la EA e individuos controles**

Se cultivaron 6 líneas de NPCs (3 afectadas con mutación en PS1 y 3 controles) en cajas de 25 cm<sup>2</sup>; cuando las líneas de NPCs alcanzaron una confluencia del 95% las células se desprendieron empleando tripsina al 0.05% y se centrifugaron a 1000 rpm para descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 400  $\mu$ l de RNAlater (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se almacenó a 4 °C. Las muestras se enviaron en hielo seco al Laboratorio Nacional de Secuenciación Genómica Tec BASE del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey para el aislamiento de RNA total, preparación de bibliotecas y secuenciación. En el Tec BASE las células resuspendidas en RNAlater se centrifugaron a 3000xg y se descartó el

sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 600 µl de solución amortiguadora de lisis suplementada con β-mercaptoetanol al 1 % y el RNA total se extrajo con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

La concentración de RNA se determinó con el kit Qubit RNA HS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y la pureza se evaluó con un sistema NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Para evaluar la integridad del RNA, las muestras se analizaron con un kit Agilent RNA 6000 Pico en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

Las bibliotecas de transcriptoma se prepararon con TruSeq Stranded Total RNA Library Prep with Ribo-Zero Gold (Illumina, San Diego, CA, USA). Las bibliotecas de transcriptomas se cuantificaron con Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen), y el tamaño de las bibliotecas se analizó en un sistema Qsep 400 (BioOptic, New Taipei City, Taiwán) y la secuenciación se realizó en un sistema NovaSeq 6000 usando una celda de flujo S1 en una configuración de lectura de extremo de par de 110 pb.

### **7.8.2. Procedimiento de análisis bioinformático para la cuantificación de genes del grupo afectado respecto al control.**

El procedimiento consistió en:

1. Filtrado (Trimmomatic: por calidad 30 y remoción de adaptadores).
2. Alineamiento contra el genoma hg36 (Star alingner, HiSAT), evaluando dos o más alineamientos para obtener el mejor resultado.
3. Cuantificación (Salmon y Kallisto).

### **7.8.3. Procesamiento de secuencias de RNA**

Después de la secuenciación, la eliminación de adaptadores y de secuencias de bases de baja calidad de secuenciación (calidad 30), con el programa Trimmomatic empleado en la línea de comandos, se realizó el alineamiento de

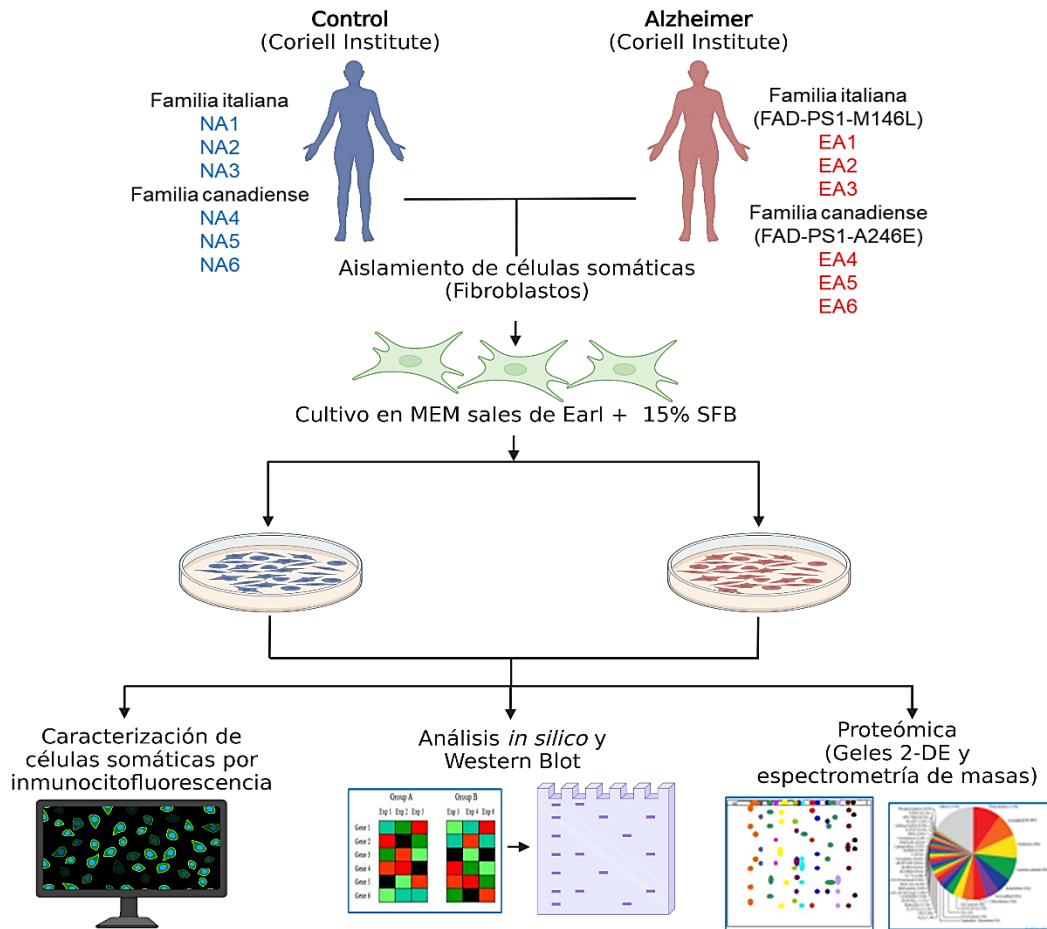
las lecturas con el genoma hg36 como referencia, mediante el programa STAR a través de la línea de comando. La cuantificación de las lecturas de genes se realizó con el programa SALMON en lenguaje Python. Una vez obtenida la lectura del gen, se realizaron los siguientes pasos en el lenguaje de programación R (versión 4.1.2). El paquete DeSeq2 R se utilizó para realizar la normalización de datos, y al final del procesamiento se evaluó que los datos presentaran una distribución normal y una mediana similar entre todos los sujetos, mediante el trazado de un histograma de cajas y bigotes.

#### **7.8.4. Análisis de secuencias de RNA**

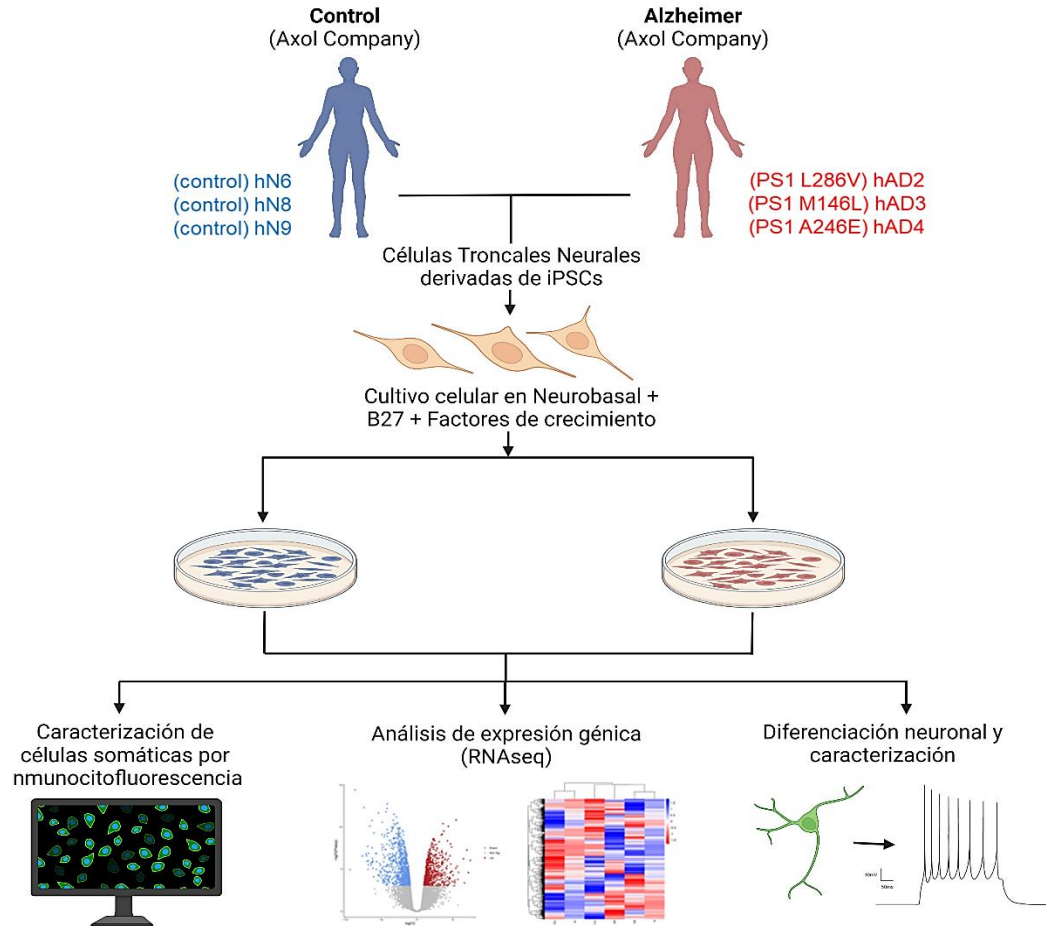
Antes de evaluar la presencia de genes expresados diferencialmente (DEG) en ambos grupos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con datos procesados utilizando la función plotPCA del paquete DeSeq2 para observar patrones de distribución de similitud y disimilitud entre muestras control (CNTRL) y EA. Para el análisis de expresión diferencial de RNA-seq en la DEA, se utilizó el paquete DeSeq2 de R; los genes con  $\logFC > 1$  y  $\text{adj.pval} < 0.05$  se consideraron DEG regulados a la alza y los genes con un  $\logFC < -1$  y un  $\text{adj.pval} < 0.05$  se consideraron DEG regulados a la baja. Para determinar la funcionalidad de los DEG regulados, se usó el paquete topGO R con el algoritmo weight01 y la prueba de Fisher, usando como fondo la suma de todos los DEG encontrados en el DEA. Se seleccionaron los primeros 10 términos de ontología de genes más enriquecidos para Función Molecular y Componente Celular, y se ilustraron en gráficos de barras.

Finalmente, se buscaron genes en común con los datos proteómicos con base en un análisis de intersección entre los DEG y los datos proteómicos del grupo afectado con la EA.

## 7.9. Estrategias de trabajo



**Figura 13. Abordaje metodológico para el modelo de células fibroblásticas.** Las 12 líneas de fibroblastos fueron cultivadas en medio MEM sales de Earl más 15% de suero fetal bovino, y se caracterizaron mediante inmunofluorescencia empleando los marcadores Vimentina y S100A4. Empleando los datos de expresión génica de Antonell y colaboradores (2013) de pacientes con Alzheimer familiar se realizó la validación de estos mediante inmunodetección de vías a asociadas a neurodegeneración, y finalmente se evaluó el perfil proteómico del grupo afectado con respecto al grupo control empleando geles de 2-DE y espectrometría de masas.



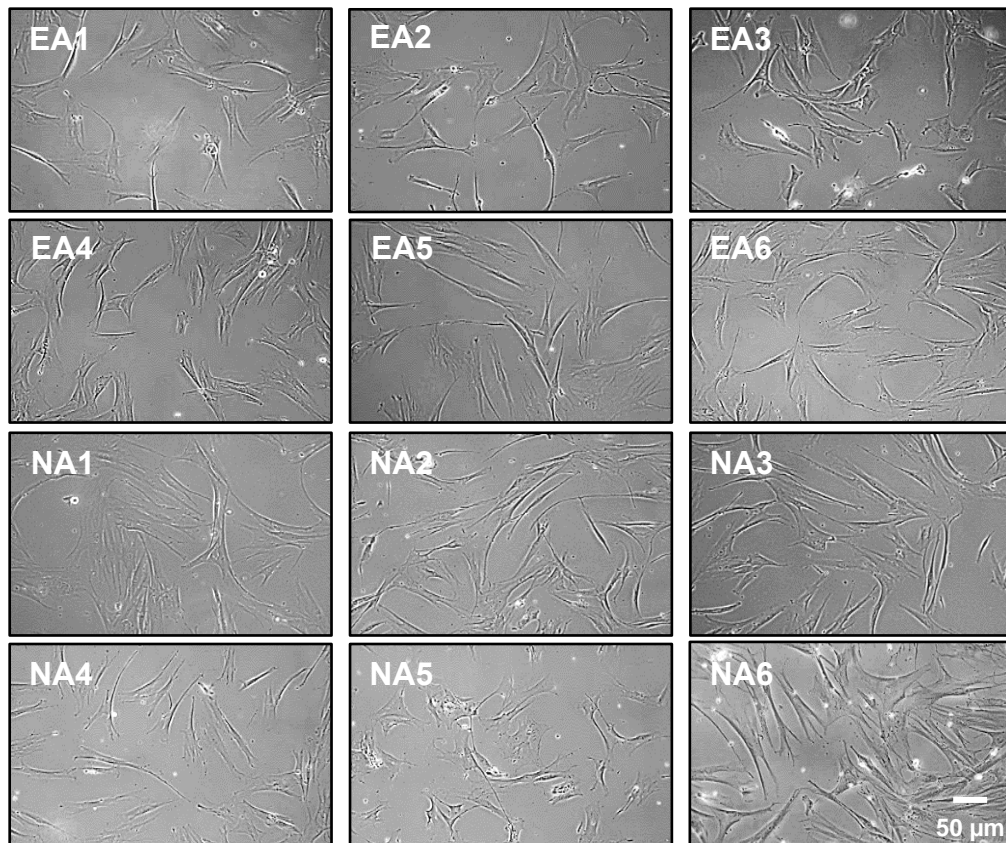
**Figura 14 Abordaje metodológico para el modelo de NPCs-iPSCs.** Los 16 cultivos de NPCs-iPSCs se mantuvieron en medio Neurobasal, B27 y factores de crecimiento (EGF + bFGF + LIF), y se caracterizaron mediante inmunofluorescencia empleando los marcadores de troncalidad neural  $\beta$ III-Tubulina, Nestina y Ki67. Se analizó la expresión diferencial de ambos grupos (controles versus Alzheimer) a través de RNA-seq y finalmente se evaluará la capacidad de diferenciación neuronal mediante electrofisiología.



## 8. Resultados

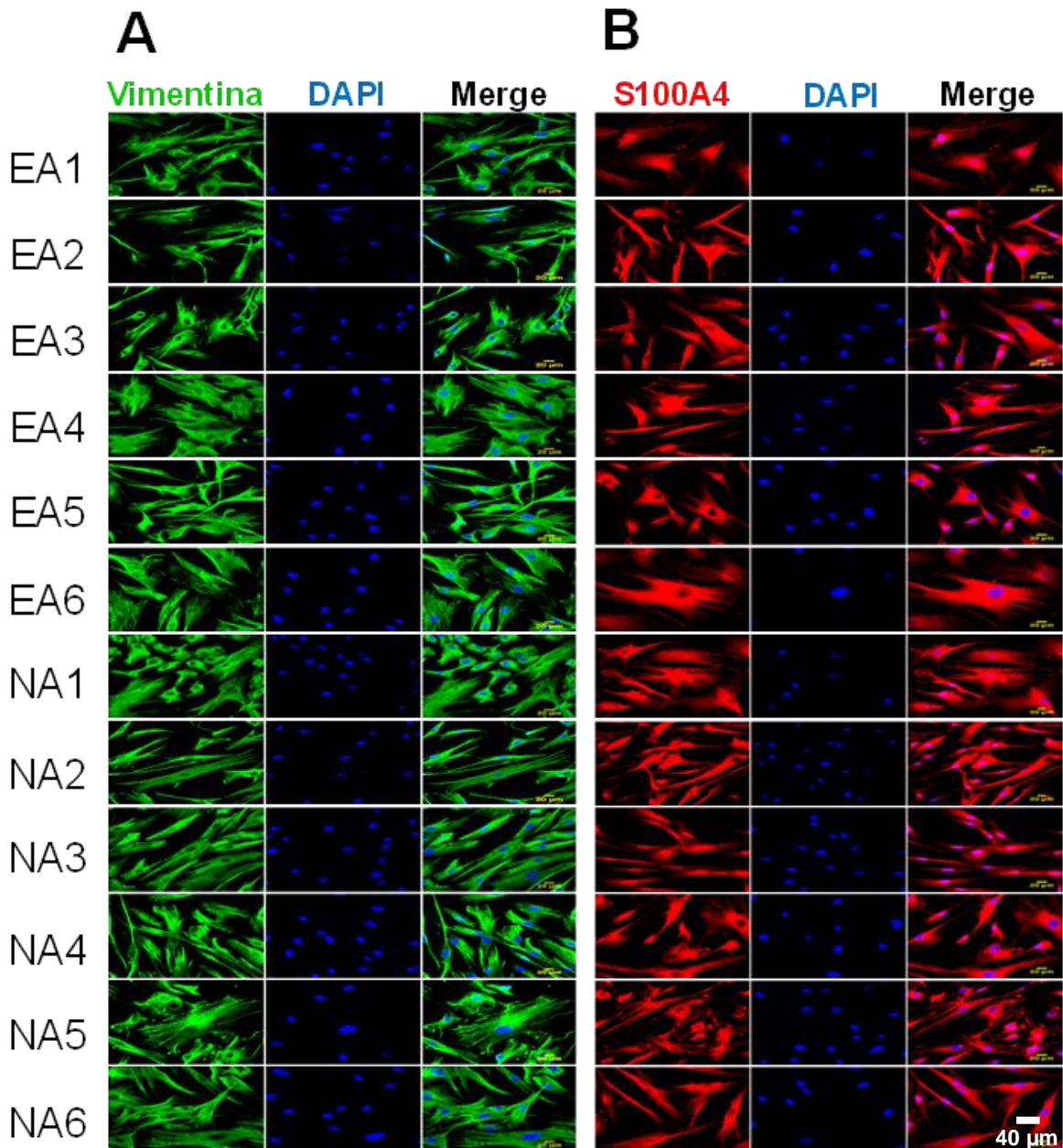
### 8.1. Cultivo y caracterización de fibroblastos de pacientes afectados con la EA y controles

Las 12 líneas de fibroblastos cultivados mostraron morfología lamelar y fusiforme, observada en microscopía de contraste de fases, así como capacidad proliferativa (observada todos los días por microscopía) hasta que las células alcanzaban la confluencia (Figura 15).



**Figura 15. Cultivo de fibroblastos obtenidos de pacientes afectados con la EA y controles.** Las células se cultivaron en Medio Esencial Mínimo con sales de Earl suplementadas con suero fetal bovino (SFB) no inactivado al 15%. Las 12 líneas celulares (6 afectadas y 6 controles) muestran morfologías fusiforme y lamelar. Las imágenes se obtuvieron de los pases de cultivo 10 a 20, aumento total 200x. Las barras de escala corresponden a 50 µm.

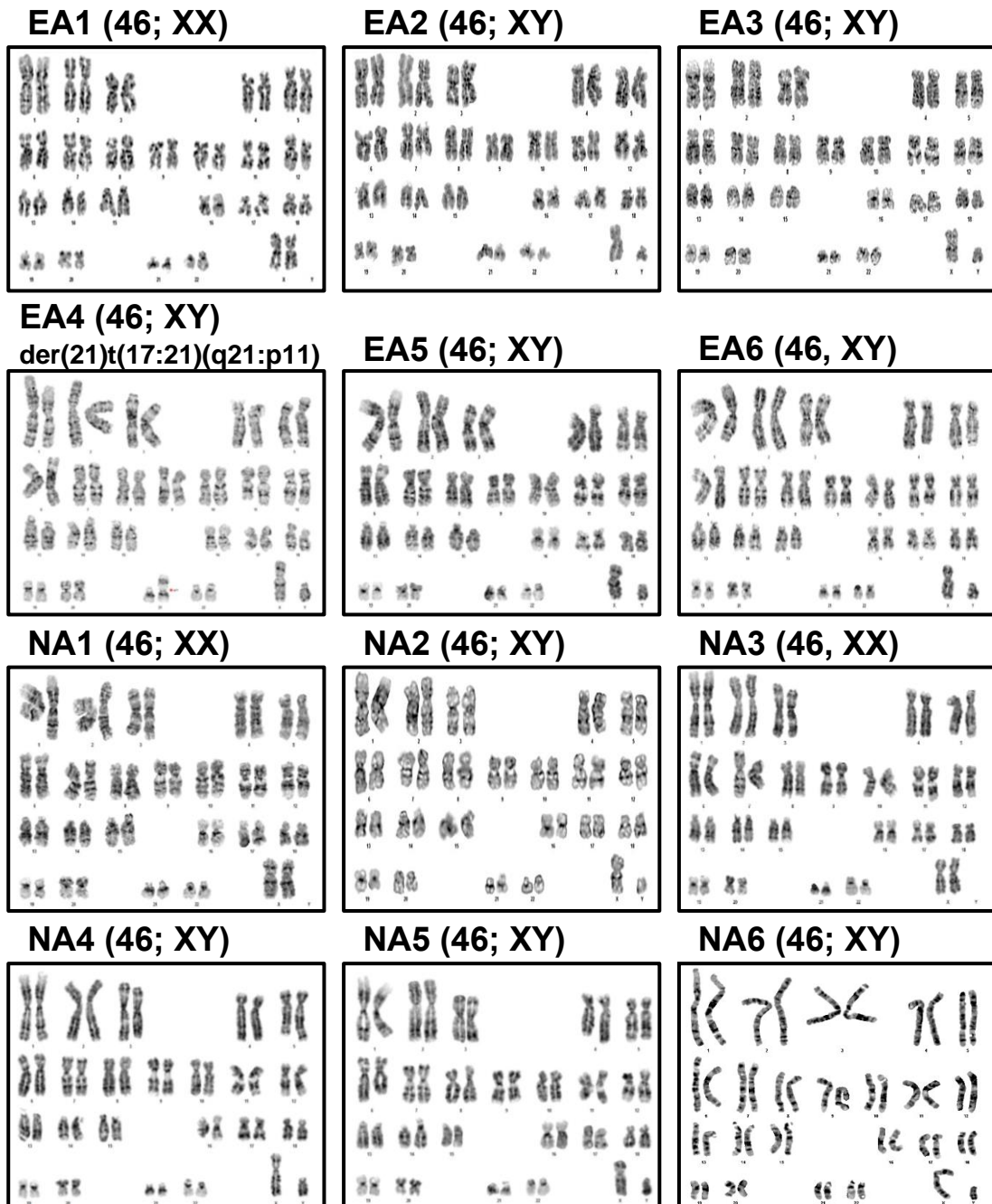
Mediante microscopía confocal se identificó la expresión de las proteínas Vimentina y S100A4, marcadores de células fibroblásticas, expresadas en las 12 líneas celulares tanto de individuos afectados con la EA como controles (Figura 16).



**Figura 16. Expresión de Vimentina y S100A4 en fibroblastos con mutaciones en PS1 (EA) y fibroblastos sin la mutación (NA).** La leyenda se presenta en la página siguiente.

**Pie da la Figura 16. Expresión de Vimentina y S100A4 en fibroblastos con mutaciones en PS1 (EA) y fibroblastos sin la mutación (NA).** La expresión de las proteínas se evaluó por inmunofluorescencia. **A.** Expresión de Vimentina (verde) en fibroblastos de individuos control (6) y afectados por la EA (6). **B.** Expresión de S100A4 (rojo) en fibroblastos de individuos control (6) y afectados por la EA (6). Todas las líneas celulares muestran morfologías fusiformes y lamelares, y expresan ambos marcadores celulares de fibroblastos. Las imágenes se obtuvieron de los pases de cultivo 10 a 20, con un aumento total 400X, y son representativas de 3 determinaciones. La barra de escala corresponde a 40  $\mu\text{m}$ .

Se evaluó la estabilidad cromosómica de los fibroblastos de los individuos afectados con la EA y controles, identificando 9 líneas celulares masculinas (46; XY), y 3 femeninas (46; XX) con numero cromosómico normal, de las cuales el cultivo EA4 presentó una traslocación (17:21) previamente reportado por el Coriell Institute (Figura 17).



**Figura 17. Cariotipos de fibroblastos de individuos afectados con la EA y sujetos control.** Se identificaron nueve cariotipos masculinos (46; XY) y tres femeninos (46; XX), con un número cromosómico normal. La línea celular EA4 posee una translocación (17:21). Para los cariotipos de banda G, las imágenes son representativas de 17-20 metafases. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de inmersión 100X.

## 8.2. Análisis de la expresión proteica diferencial entre los fibroblastos afectados con la EA y los controles mediante Western Blot

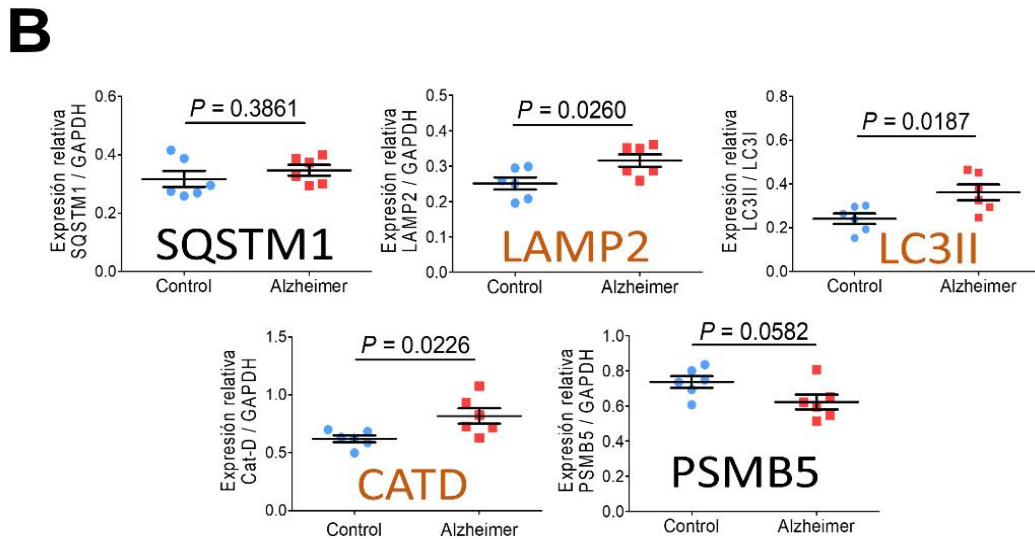
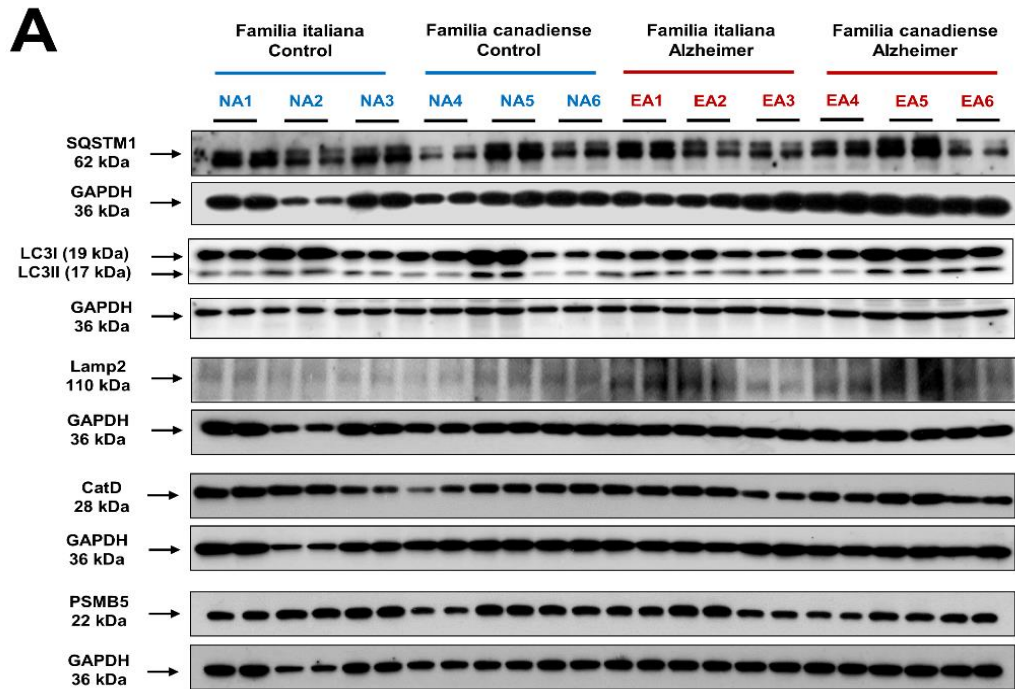
Con los datos de expresión génica reportados por el grupo de Antonell et al., (Antonell et al., 2013) de 14 muestras cerebrales (corteza cingulada posterior, a nivel del tálamo) de siete individuos controles y siete individuos afectados con la EA (mutaciones en PS1: M139T, V89L y E120G) se identificaron cambios (aumento o disminución) en ~3,400 genes entre los individuos afectados con la EA y controles con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Se identificaron genes relacionadas con vías de señalización de supervivencia celular, de la vía autofágica, de la vía proteasomal, del metabolismo lipídico, de receptores fibroblásticos, de MAPKs, de inflamación, de estrés oxidante y de fosforilación de la proteína tau (Tabla 5) asociados a neurodegeneración, los cuales se evaluaron a nivel proteico mediante inmunodetección en las células fibroblásticas.

**Tabla 5.** Genes asociados con neurodegeneración en la EA identificados en análisis de expresión diferencial de la base de datos de microarreglos GEO2R número de acceso GSE39420.

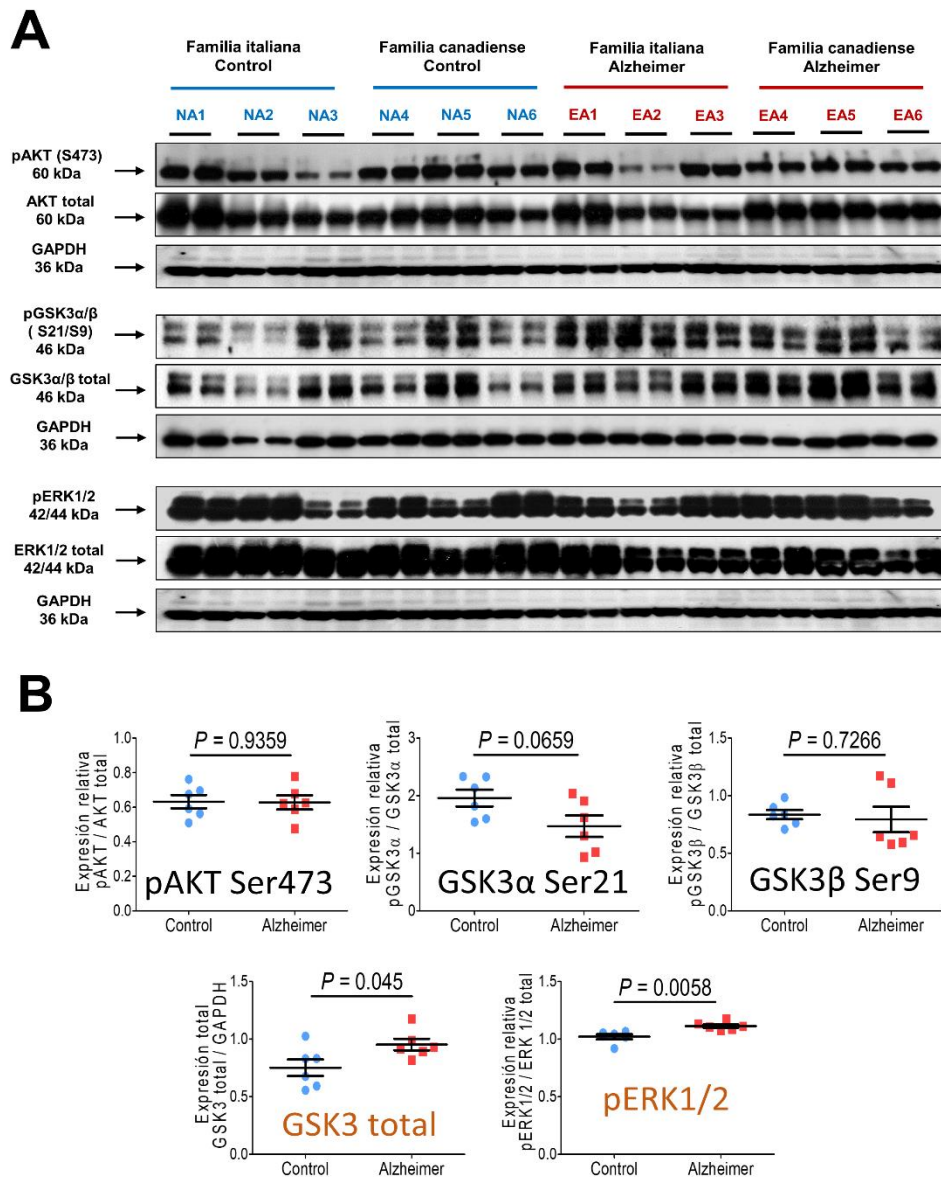
Nombre del gen	ID del transcripto	Valor de cambio	Regulación	Descripción
<b>Vía autofágica-lisosomal</b>				
LAMP1	NM_005561	1.37	Aumento	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LAMP2	NM_013995	1.49	Aumento	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>
CATSH	NM_004390	2.19	Aumento	<i>Cathepsin H</i>
ULK1	NM_003565	-1.60	Disminución	<i>Unc-51-like kinase 1</i>
MAP1LC3A	NM_032514	-1.43	Disminución	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 Alpha</i>
<b>Vía proteasomal</b>				
PSMB9	NM_002800	1.49	Aumento	<i>Proteasome subunit, beta type, 9</i>
<b>Vías de las MAP cinasas</b>				
MAPK8	NM_002754	-1.37	Disminución	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
MAPK10	NM_002750	-1.71	Disminución	<i>Mitogen-activated protein kinase 10</i>
MAPK13	NM_138982	-2.11	Disminución	<i>Mitogen-activated protein kinase 13</i>
<b>Vías de cinasas relacionadas a la hiperfosforilación de la proteína tau</b>				
GSK3B	NM_002093	-1.41	Disminución	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>

La inmunodetección mostró que el grupo de individuos afectados con la EA de las familias italiana y canadiense presentan un aumento en la expresión del marcador de autofagia LC3II ( $p = 0.0187$ , t de Student) comparados con el grupo de fibroblastos controles, y no se observó cambio en la expresión de SQSTM1(p62) ( $p = 0.3861$ , t de Student) entre el grupo control y afectado (Figura 18). Con relación a la vía lisosomal que continúa a la autofagia, se observó aumento de los marcadores LAMP2 ( $p = 0.0260$ , t de Student) y CatD ( $p = 0.0226$ , t de Student) en los fibroblastos de individuos afectados con la EA respecto al grupo control (Figura 18). En el inmunoblot se observó que en las células provenientes de pacientes con la EA la expresión de la proteína PSMB5, marcador de la vía del proteasomal, mostró tendencia a disminuir ( $p = 0.0582$ , t de Student) (Figura 18).

Se analizaron proteínas de sobrevivencia celular de los grupos de fibroblastos tanto controles como afectados con la EA, sin encontrar cambios en la fosforilación en el residuo Serina<sup>473</sup> de la proteína AKT ( $p = 0.9359$ ) (Figura 19). La cinasa GSK3, involucrada en la fosforilación de la proteína tau, presentó una tendencia a la disminución de las fosforilaciones en la Serina<sup>21</sup> de la isoforma GSK $\alpha$  ( $p = 0.0659$ ) y la Serina<sup>9</sup> de la isoforma GSK $\beta$  ( $p = 0.7299$ ) del grupo afectado; así mismo, la expresión total de la cinasa GSK3 presenta un aumento significativo ( $p = 0.045$ ) en el grupo afectado con respecto al grupo sin la EA (Figura 19). Las MAPKs, también involucradas en las fosforilaciones patológicas de la proteína tau, y se identificó que los fibroblastos de los sujetos afectados con la EA presentan aumento en la fosforilación de los residuos Treonina<sup>202</sup> y Tirosina<sup>204</sup> de ERK-1/2 ( $p = 0.0058$ ) con respecto al grupo control (Figura 19). Además, se evaluó la fosforilación de la proteína tau en los residuos Treonina<sup>231</sup>, Serina<sup>396</sup> y Serina<sup>404</sup>, asociada a la EA, observándose un aumento significativo en los fibroblastos de pacientes con las mutaciones en PS1, mientras que la fosforilación de tau en los residuos Treonina<sup>181</sup>, Serina<sup>202</sup> y Serina<sup>205</sup>, la expresión total de la proteína tau y los niveles de A $\beta$ PP no presentaron cambios significativos con respecto a los individuos control (Figura 20).

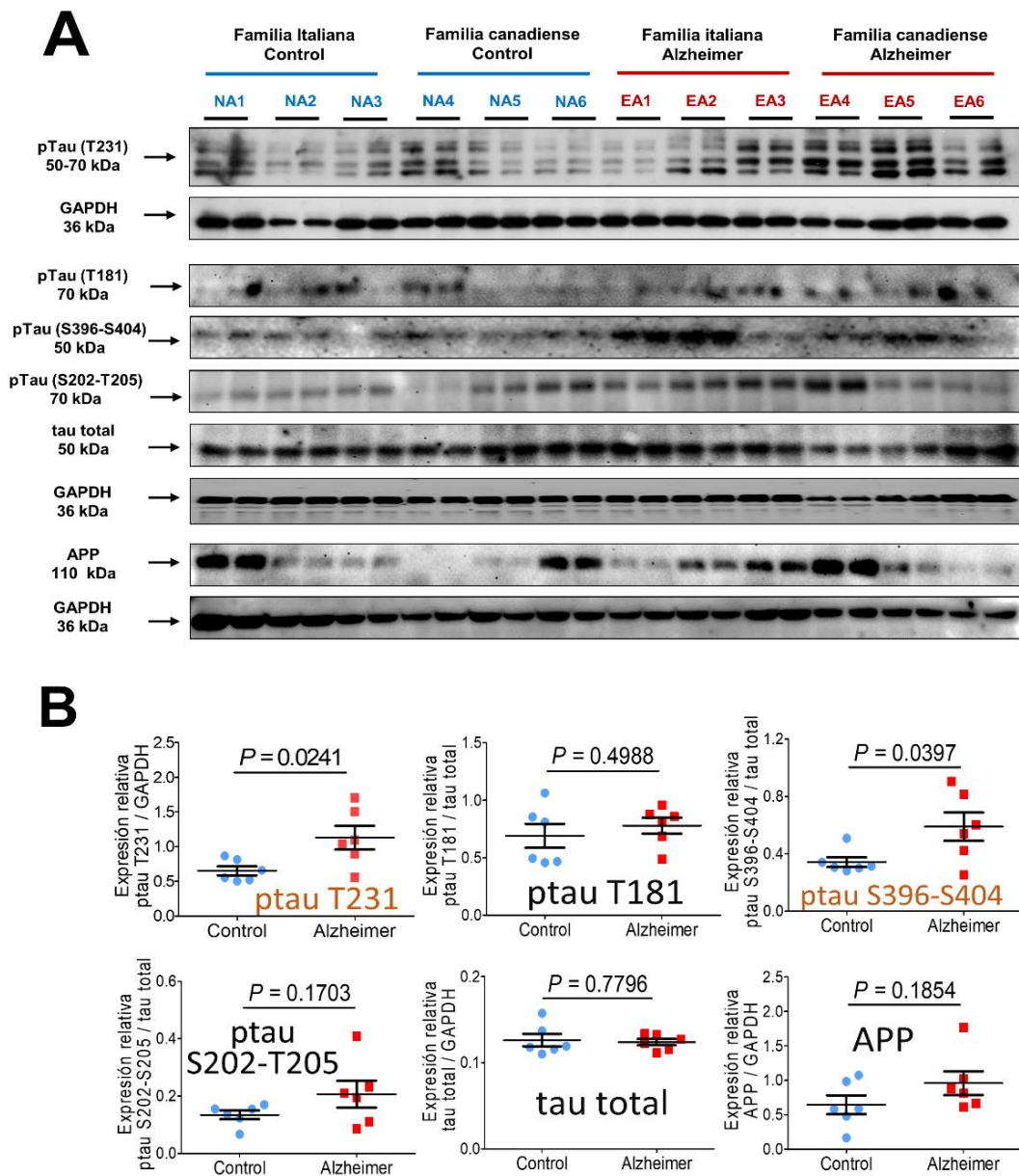


**Figura 18. Inmunodetección de marcadores autofágicos (SQSTM1 y LC3II), lisosomales (LAMP2 y CatD) y proteasomales (PSMB5) en fibroblastos de individuos afectados con la EA.** Las proteínas se evaluaron mediante Western blot. **A.** Inmunoblot de extractos proteicos de fibroblastos de individuos control (6) y afectados con la EA (6). Las muestras se analizaron por duplicado. **B.** Análisis densitométrico de SQSTM1, LC3II/LC3I, LAMP2, CatD y PSMB5. Los niveles de proteína se normalizaron contra GAPDH. Los puntos en los gráficos representan el valor promedio de los duplicados de las muestras. NA: No Afectado; EA: Enfermedad de Alzheimer. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student.



**Figura 19. Inmunodetección de marcadores de supervivencia celular (pAKT-Serina<sup>473</sup>), fosforilación de cinasas involucradas en la hiperfosforilación de la proteína tau (GSK3α-Serina<sup>21</sup>, GSK3β-Serina<sup>9</sup> y ERK-1/2 Treonina<sup>202</sup>/Tirosina<sup>204</sup>) en fibroblastos de individuos afectados con la EA. A. Inmunoblot de extractos proteicos de fibroblastos de individuos control (6) y afectados con la EA (6). Las muestras se analizaron por duplicado. B. Análisis densitométrico de pAKT-Serina<sup>473</sup>, GSK3α-Serina<sup>21</sup>, GSK3β-Serina<sup>9</sup>, GSK3 total y ERK-1/2-Treonina<sup>202</sup>/Tirosina<sup>204</sup>. Los niveles de fosforilación de proteínas se normalizaron a su contenido de proteína total y la GSK3 total se normalizó frente a GAPDH. Los puntos en los gráficos representan el valor promedio de duplicados para cada muestra. NA: No Afectado; EA: Enfermedad de Alzheimer. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student.**



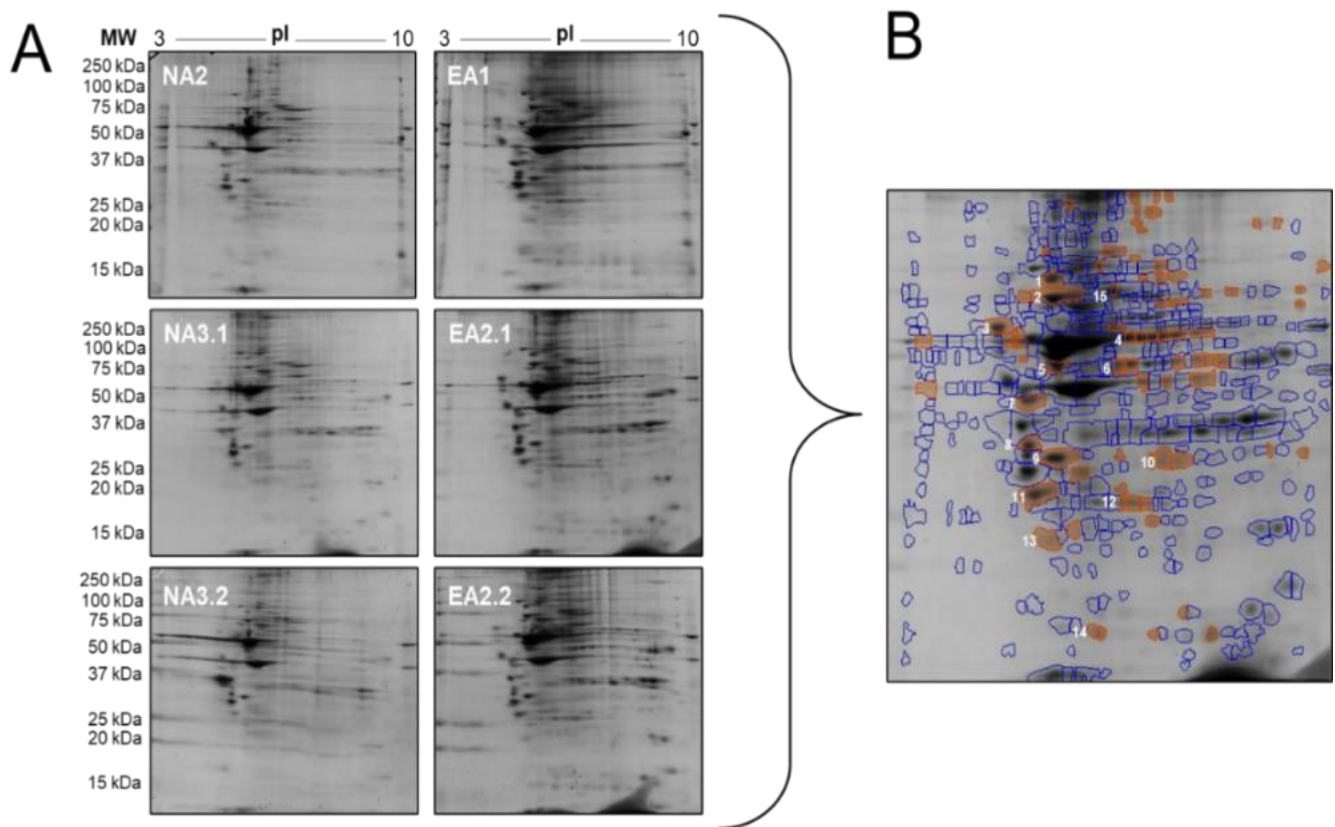


**Figura 20. Inmunodetección de la proteína precursora de amiloide (A $\beta$ PP) y fosforilaciones patológicas de la proteína tau (Treonina<sup>231</sup>, Treonina<sup>181</sup>, Serina<sup>404</sup> y Serina<sup>396</sup>) en fibroblastos afectados con la EA.** Las proteínas se evaluaron mediante Western blot. **A.** Inmunoblots de extractos proteicos de fibroblastos de individuos control (6) y afectados con la EA (6). Las muestras se analizaron por duplicado. **B.** Análisis densitométricos de los niveles de A $\beta$ PP, ptau-Treonina<sup>231</sup>, ptau-Treonina<sup>181</sup>, ptau Serina<sup>404</sup>-Serina<sup>396</sup> y tau total. La cantidad de A $\beta$ PP y tau total se normalizó con GAPDH y las fosforilaciones de la proteína tau se normalizaron con los niveles de tau total. Los puntos en los gráficos representan el valor promedio de los duplicados para cada muestra. NA: No Afectado; EA: Enfermedad de Alzheimer. El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student.

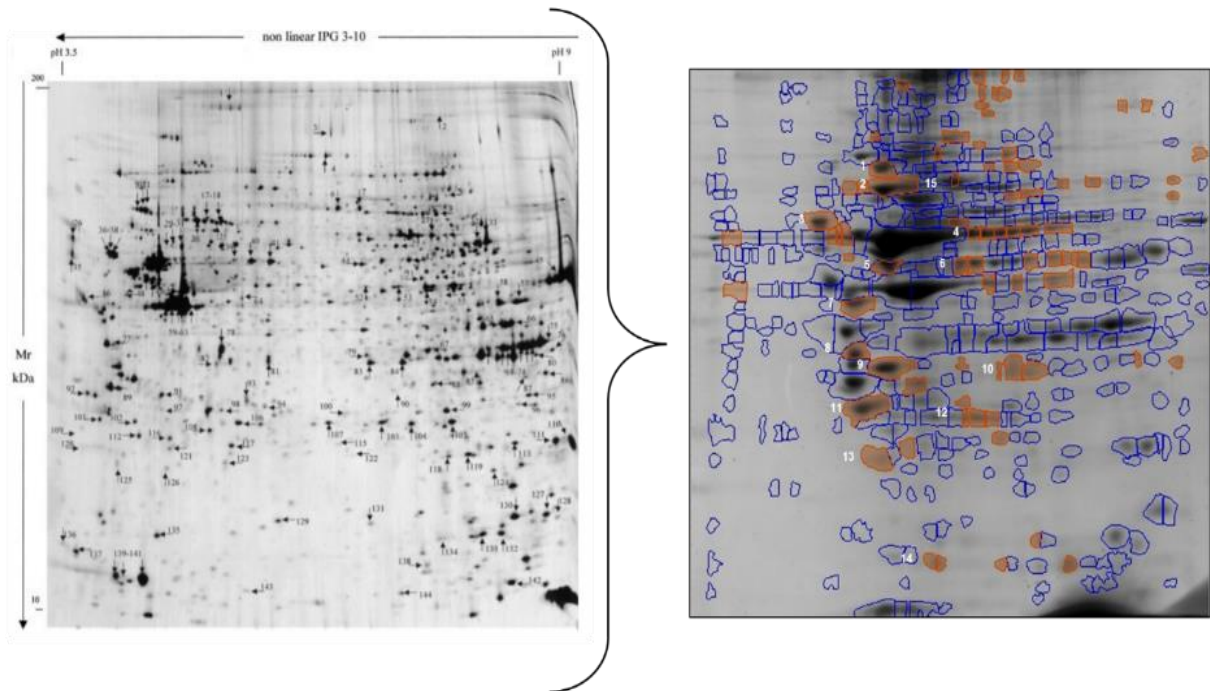
## **8.3. Proteómica**

### **8.3.1. Geles de 2-DE**

El análisis densitométrico de los puntos (spots) de los geles 2-DE generados a partir de los extractos proteicos totales de los fibroblastos afectados con la EA (EA1 y EA2) y controles (NA2 y NA3), mostraron diferencias significativas en 68 de los 410 spots identificadas con el programa SameSpots (Figura 21). Con base en la coincidencia de los *spots* presentes en los geles experimentales con los de un mapa de referencia de proteínas fibroblásticas (Boraldi et al., 2003; Karring et al., 2004; Puricelli et al., 2006) con IEF de pH-3-10, se identificaron 15 proteínas con expresión diferencial a la alza en los fibroblastos portadores de mutaciones en PS1 (Figura 22), siendo las proteínas de estrés celular HSP90, HSP70 y HSP27 las de mayor significancia y predominio (Tabla 6).



**Figura 21. Cambios en la expresión de proteínas en fibroblastos de pacientes afectados con la EA familiar (EA1 y EA2) y fibroblastos de individuos control (NA2 y NA3).** Las proteínas se separaron por peso molecular y punto isoeléctrico utilizando geles 2-DE. **A.** Imágenes escaneadas de los geles 2-DE revelados con azul de Coomassie; se presentan 2 réplicas biológicas y 2 réplicas experimentales. **B.** Imagen representativa de los 410 puntos (azul) identificados en los geles 2-DE, de los cuales 68 puntos (rojo) presentaron diferencia significativa determinada por el programa *SameSpot*, a partir de los cuales 15 proteínas se reconocieron mediante mapas proteómicos de referencia derivados de fibroblastos. El análisis estadístico se realizó con ANOVA.



**Figura 22. Comparación de puntos (spots) empleando un gel de referencia de proteínas derivadas de fibroblastos de piel.** Mediante el programa *SameSpot* se compararon mediante las coordenadas de peso molecular y punto isoelectrico los puntos de coincidencia entre el gel de referencia y los puntos del gel experimental y la espectrometría de masas reportada por Boraldi et al. (Boraldi et al., 2003), lo que permitió identificar los puntos de coincidencia. En azul se presentan los puntos totales del gel 2-DE, y en rojo los puntos con diferencia significativa entre el grupo afectado con la EA y el grupo control.

**Tabla 6.** Spots identificados en los geles 2-DE de los fibroblastos afectados con la EA y controles.

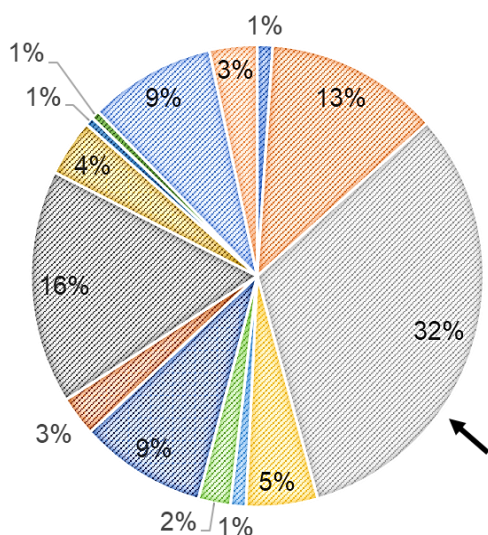
Spot	Proteína	pI-pH (Experimental)	Mw kDa (Experimental)	Promedio de volúmenes normalizados		Cambio (veces)	ANOVA (P)
				Control	EA		
1	HSP90	5.21	91	2.432e+007	5.138e+007	2.1	6.536e-004
2	HSP70	5.22	74	9.669e+007	1.449e+008	1.5	0.048
3	CRTC	4.43	62	2.749e+007	5.187e+007	1.9	0.031
4	TCPB	6.28	57	9.962e+006	2.503e+007	2.5	0.044
5	ATPB/PDA6	5.28	48	3.255e+007	5.442e+007	1.7	0.036
6	ENOA	6.19	48	1.062e+007	2.279e+007	2.1	0.003
7	SET	4.86	40	3.114e+007	5.682e+007	1.8	0.026
8	TPM1	4.87	33	2.722e+007	4.812e+007	1.8	0.032
9	ANXA	5.23	31	7.722e+007	1.065e+008	1.4	0.021
10	ESTD	6.75	31	1.011e+007	1.891e+007	1.9	0.023
11	CANS	4.97	27	5.690e+007	1.150e+008	2.0	0.017
12	HSP27	6.28	26	3.624e+006	6.479e+006	1.8	0.008
13	ATPQ	5.22	22	1.761e+007	2.624e+007	1.5	0.035
14	FINC	5.87	16	1.947e+006	4.673e+00	2.4	0.002
15	CALD	6.07	80	9.831e+006	1.592e+007	1.6	0.031

### **8.3.1. Análisis bioinformático de los perfiles proteicos obtenidos por la espectrometría de masas (Bases de datos Panther y String)**

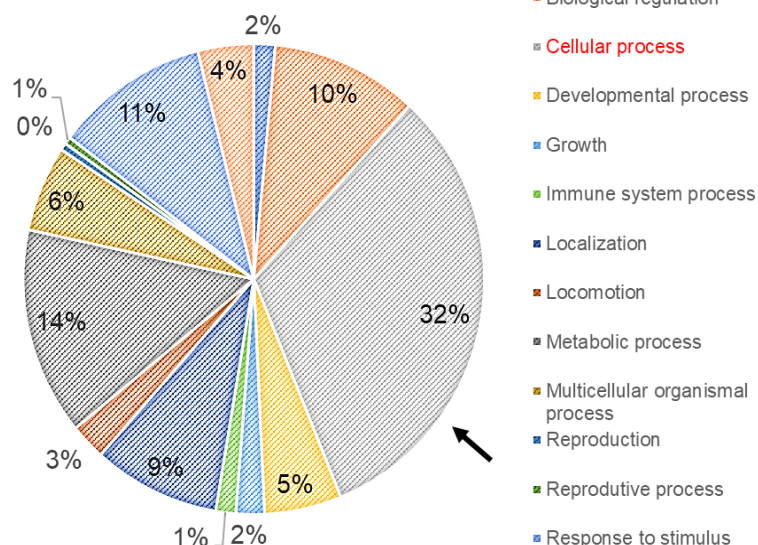
A partir de las listas de proteínas reportadas por la espectrometría de masas de las muestras de fibroblastos afectados con la EA y controles, se seleccionaron aquellas que presentaron un valor de probabilidad de 99% de estar presentes en las muestras representado como un valor "OK" igual a 2, y que fueran de la especie humana. Así mismo, se separaron en aquellas proteínas expresadas en la muestra de individuos afectados o en la muestra de controles (Ver anexos). Con la nomenclatura génica de las proteínas de ambos grupos se procedió a construir los interactomas (Redes de asociación de proteínas funcionales) empleando la sección *Single Protein by Name* de la base de datos *String* (<https://string-db.org/>), seleccionando en los interactomas grupos de proteínas basadas en su función celular. En paralelo, empleando la base de datos *Panther* (<http://pantherdb.org/>) para clasificación de ontología génica en la sección *Gene List Analysis* se analizaron las listas de proteínas de ambos grupos seleccionando el estudio de clasificación funcional de proceso biológico y la subclasificación de proceso celular en su vista de gráfico de pastel.

A partir de estos datos el análisis se enfocó en la categoría de procesos celulares de ambos grupos de fibroblastos; en esta subclasificación se identificaron variaciones en las vías de señalización asociadas al plegamiento de proteínas y a la vía autofágica mediada por chaperonas en la muestra afectada con la EA identificando la expresión de HSP71, HSP90, HSPD1 y HSPE1 (Figuras 23 y 24). Estos mismos datos fueron analizados en la plataforma de *String Database* para la creación de interactomas que evidenciaron un grupo (clúster) de proteínas asociadas a estrés celular en los fibroblastos afectados por la EA (Figura 25).

## A Control

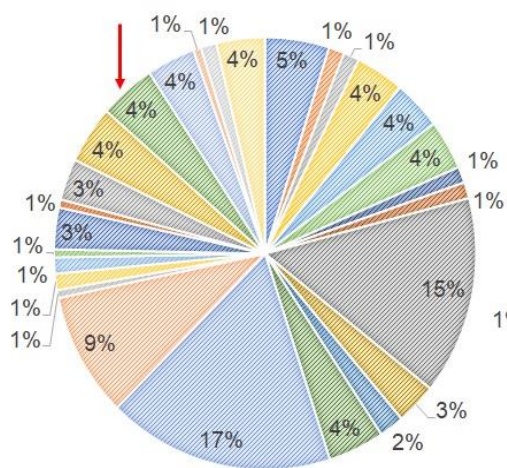


## B Alzheimer



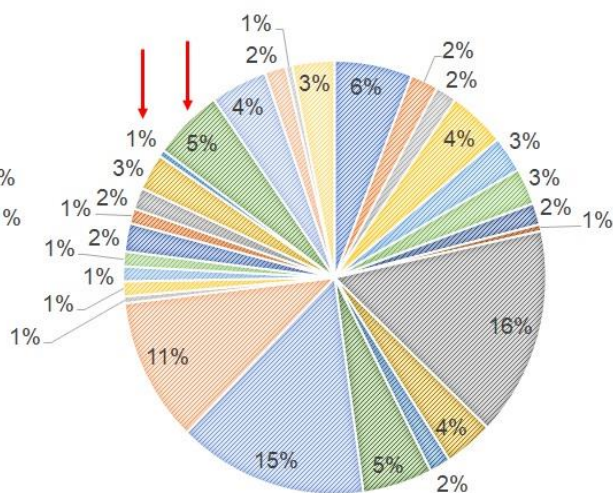
**Figura 23. Clasificación ontológica de la función molecular de las proteínas identificadas en fibroblastos derivados de paciente (EA1 y EA2) e individuos control (NA2 y NA3).** Los datos de la espectrometría de masas de extractos de proteína total fibroblástica se analizaron en la base de datos Panther Gene Ontology. **A, B.** Distribución de las proteínas de los fibroblastos de los individuos NA2 y NA3 (**A**) así como EA1 y EA2 (**B**), de acuerdo con su función molecular. En ambos paneles, los valores se expresan como porcentaje del número de proteínas identificadas por la espectrometría de masas. La flecha indica la ontología génica dado el mayor número de proteínas distribuidas en esta clasificación y su asociación con vías de señalización intracelular relacionadas con neurodegeneración.

## A. Control



1	HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90 family chaperone	Homo sapiens
2	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	Chaperone	Homo sapiens
3	CALR	Calreticulin	Chaperone	Homo sapiens
4	HSPB1	Heat shock protein beta-1	Chaperone	Homo sapiens
5	HSP90B1	Endoplasmic	Hsp90 family chaperone	Homo sapiens
6	P4HB	Protein disulfide isomerase	Chaperone	Homo sapiens
7	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	Hsp90 family chaperone	Homo sapiens

## B. Alzheimer



1	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	Hsp70 family chaperone	Homo sapiens
2	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	Chaperone	Homo sapiens
3	HSPB1	20 kDa heat shock protein, mitochondrial	Chaperonin	Homo sapiens
4	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hsp70 family chaperone	Homo sapiens
5	HSPD1	60 kDa heat shock Protein, mitochondrial	Chaperonin	Homo sapiens
6	CALR	Calreticulin	Chaperone	Homo sapiens
7	HSPB1	Heat shock Protein beta-1	Chaperone	Homo sapiens
8	HSP90B1	Endoplasmic	Hsp90 family chaperone	Homo sapiens
9	P4HB	Protein disulfide isomerase	Chaperone	Homo sapiens
10	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta	Hsp90 family chaperone	Homo sapiens

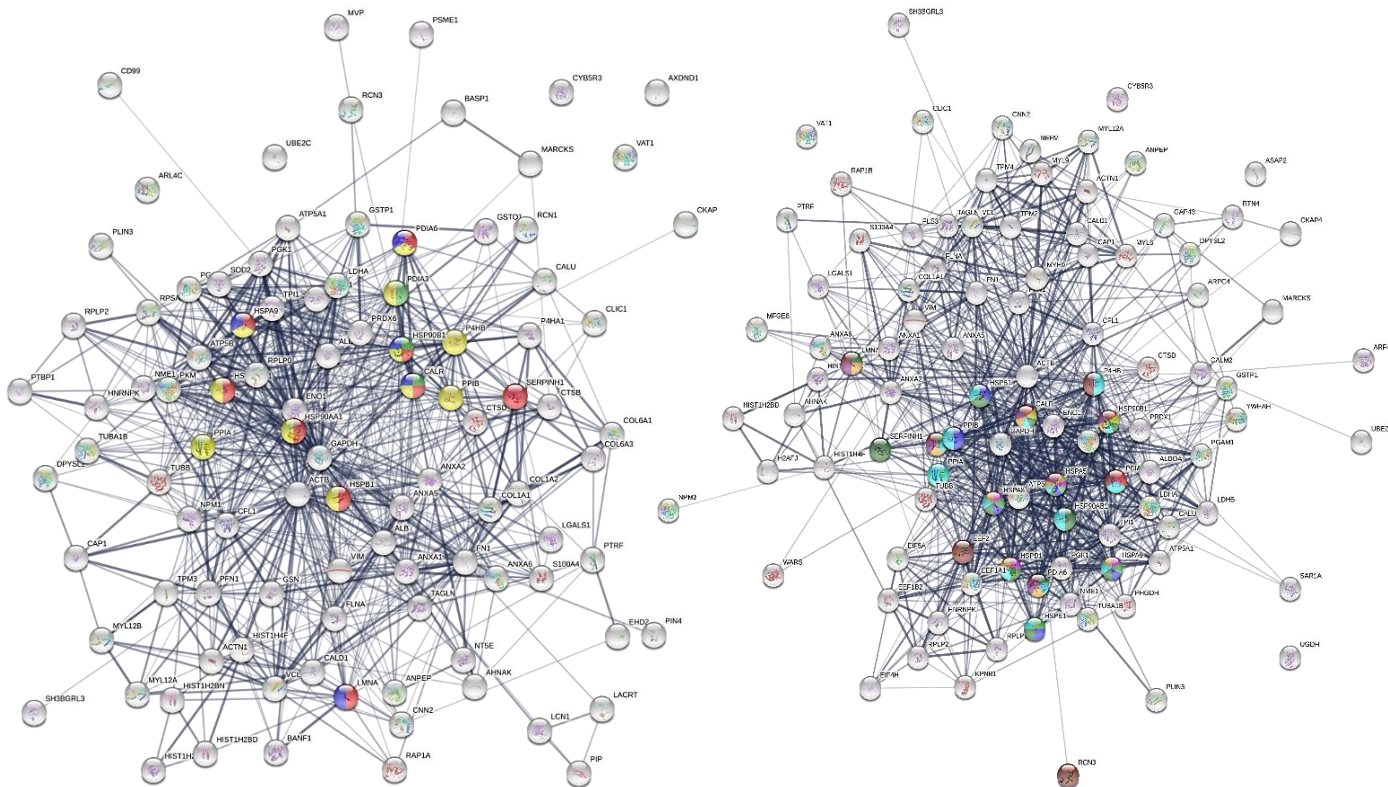
- Actin filament-based process
- Cell activation
- Cell adhesion
- Cell communication
- Cell cycle process
- Cell cycle
- Cell death
- Cell population
- Cell component organization of biogenesis
- Cellular developmental process
- Cellular homeostasis
- Cellular localization
- Cellular metabolic process
- Cellular response to stimulus
- Chromosome segregation
- Exocytic process
- Export from cell
- Intermediated filament-based process
- Localization of cell
- Maintenance of location in cell
- Microtubule-based process
- Movement of cell or subcellular component
- Process utilizing autophagic mechanism
- Protein folding
- Signal transduction
- Transmembrane transport
- Vesicle targeting
- Vesicle-mediated transport

**Figura 24. Procesos celulares correspondientes a las proteínas identificadas en los fibroblastos derivados de los pacientes (EA1 y EA2) y los individuos control (NA2 y NA3).** De la clasificación ontológica de la función molecular, se seleccionó la subclasificación de procesos celulares (representando ~30% de las proteínas identificadas por la espectrometría de masas). **A.** Distribución de las proteínas de los fibroblastos de los individuos NA2 y NA3 de acuerdo con el proceso celular en el que intervienen. **B.** Distribución de proteínas de fibroblastos de EA1 y EA2 individuales según el proceso celular en el que están implicadas. En ambos paneles, los valores se expresan como porcentaje del número de proteínas identificadas en la clasificación molecular. Las flechas señalan cambios relacionados con el plegamiento de proteínas y procesos que emplean mecanismos autofágicos, y las tablas muestran que los individuos afectados con la EA presentan mayor número de proteínas de respuesta al estrés.



## A. Control

## B. Alzheimer

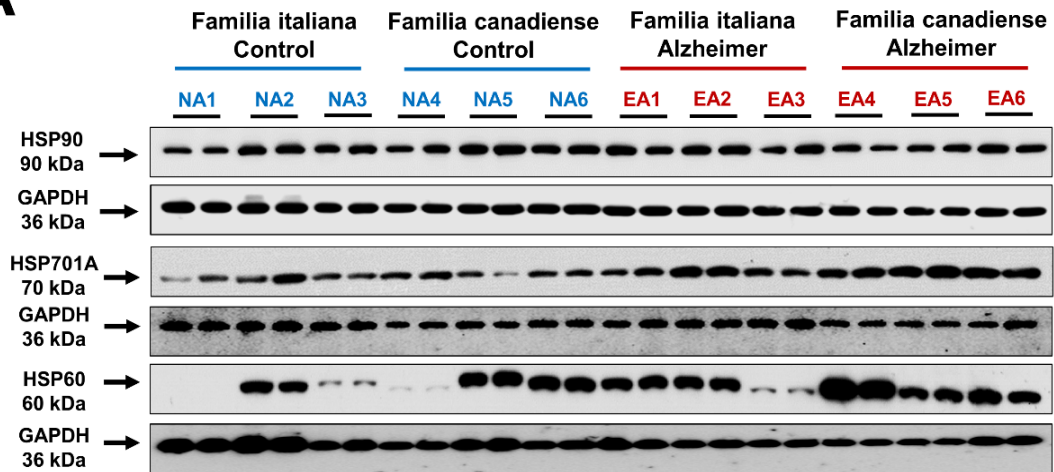
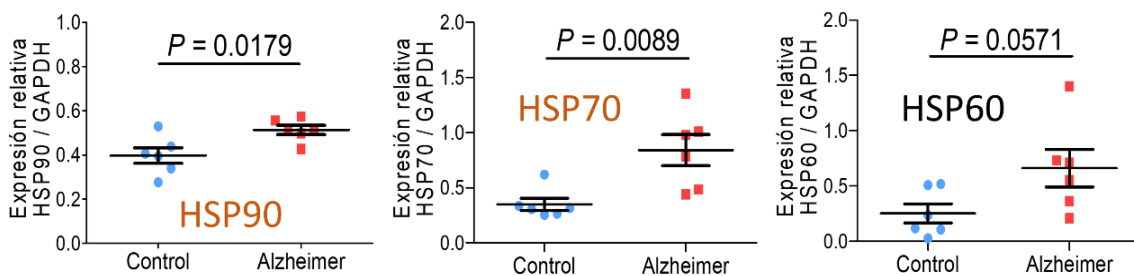


COLOR	TERM ID	TERM DESCRIPTION	OBSERVED GENE COUNT	BACKGROUND GENE COUNT	STRENGTH	FALSE DISCOVERY RATE
yellow	GO:0006457	Protein folding	11	213	1	3.89E-06
red	GO:0006986	Response to unfolded protein	9	166	1.03	4.19E-05
limegreen	GO:0034975	Protein folding in endoplasmic reticulum	3	10	1.77	0.0029
blue	GO:0034620	Cellular response to unfolded protein	5	129	0.88	0.0333

COLOR	TERM ID	TERM DESCRIPTION	OBSERVED GENE COUNT	BACKGROUND GENE COUNT	STRENGTH	FALSE DISCOVERY RATE
cyan	GO:0006457	Protein folding	15	213	1.13	4.42E-10
darkgreen	GO:0006986	Response to unfolded protein	13	166	1.18	4.33E-09
orange	GO:0034620	Cellular response to unfolded protein	9	129	1.13	7.46E-06
red	GO:0034975	Protein folding in endoplasmic reticulum	4	10	1.88	9.47E-05
blue	GO:0081077	Chaperone-mediated protein folding	6	55	1.32	0.0001
maroon	GO:0034976	Response to endoplasmic reticulum stress	10	256	0.87	0.00016
magenta	GO:0042026	Protein refolding	4	18	1.63	0.00051
limegreen	GO:0051085	Chaperone cofactor-dependent protein refolding	4	29	1.42	0.002
purple	GO:0030968	Endoplasmic reticulum unfolded protein response	6	106	1.04	0.0021
yellow	GO:0036500	ATF6-mediated unfolded protein response	3	9	1.81	0.0023

**Figura 25. Grupo de proteínas de respuesta al estrés (HSP) identificadas en los extractos proteicos de los fibroblastos de pacientes con la EA familiar (EA1 y EA2) con la mutación M146L.** Las proteínas identificadas en la espectrometría de masas de los fibroblastos con la EA familiar (EA1 y EA2) y fibroblastos de control (NA2 y NA3) se analizaron en la plataforma de base de datos *String* y se generaron interactomas basados en las asociaciones funcionales y físicas. **A.** Interactoma de proteínas para los fibroblastos de los individuos control. **B.** Interactoma proteico para los fibroblastos de los pacientes con la EA familiar (EA1 y EA2), mismo que identifica la presencia de proteínas de choque térmico. Para cada interactoma, el número de procesos biológicos asociados con el plegamiento de proteínas mediado por chaperonas se indica en el panel inferior de esta figura, tanto para los individuos control (**A**) como afectados por la EA familiar (**B**), destacando la magnitud del enriquecimiento como índice de lo que se observa y lo que se espera, y el valor de la tasa de descubrimiento falso como medida de la significancia del enriquecimiento. El grosor de las líneas entre las proteínas indica la fuerza de la asociación.

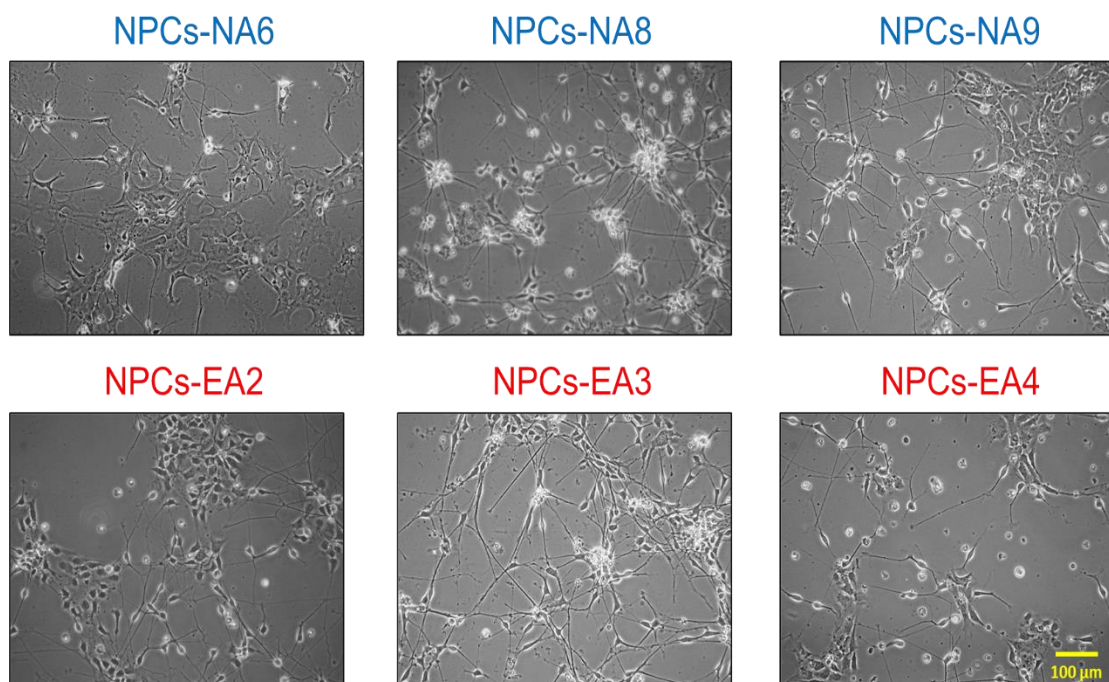
El análisis proteómico evidenció cambios a nivel molecular en cuatro líneas celulares de fibroblastos, por lo que se decidió evaluar por inmunodetección en las 12 muestras de fibroblastos la expresión proteica de HSP90, HSP70 y HSP60 para validar la existencia de alteraciones en las proteínas de respuesta a estrés celular. Se advirtió un incremento significativo en la expresión de las proteínas HSP90 y HSP70 en el grupo afectado con la mutación en PS1, con una tendencia al aumento en la expresión de HSP60 con respecto al grupo control (Figura 26). Estos resultados apoyan los cambios observados en el estudio de espectrometría de masas y geles 2-DE, mostrando que las muestras de fibroblastos afectados con la EA presentan un aumento en la respuesta al estrés que podrían deberse a la presencia de mutaciones en PS1.

**A****B**

**Figura 26. Inmunodetección de los marcadores de estrés celular HSP90, HSP70 y HSP60 en fibroblastos de pacientes con la EA.** Las proteínas se evaluaron mediante Western blot. **A.** Inmunoblot de extractos proteicos de fibroblastos de individuos control (6) y afectados con la EA (6). Las muestras se analizaron por duplicado. **B.** Análisis densitométrico de la expresión de HSP90, HSP70 y HSP60. Los niveles de proteína se normalizaron contra GAPDH. Los puntos en los gráficos representan el valor promedio de los duplicados para cada muestra. NA; No Afectado. EA; Enfermedad de Alzheimer El análisis estadístico se realizó con la prueba t de *Student*.

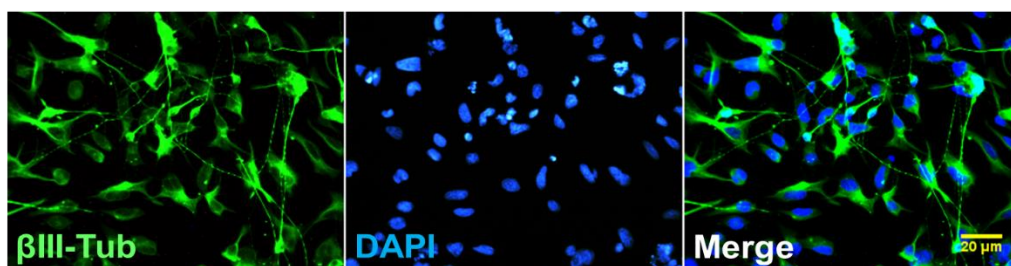
#### 8.4. Cultivo y caracterización de NPCs-iPSCs afectados con la EA y controles

Las 6 líneas de NPCs-iPSCs derivadas de la reprogramación de fibroblastos de pacientes con la EA y controles obtenidos de la compañía Axol Bioscience mostraron morfología similar a la neuronal con prolongaciones finas y somas pequeños y algunas con morfología de precursores neurales con somas anchos y prolongaciones más cortas (Figura 27). Mediante microscopía confocal se identificó la expresión de las proteínas  $\beta$ III-Tubulina y Nestina, marcadores de troncalidad neural, así como de la proteína Ki67, marcador de proliferación celular, en una línea control (NPCs-NA8) y otra derivada de paciente afectado con mutación en PS1-M146L (NPCs-EA3) (Figuras 28 y 29).

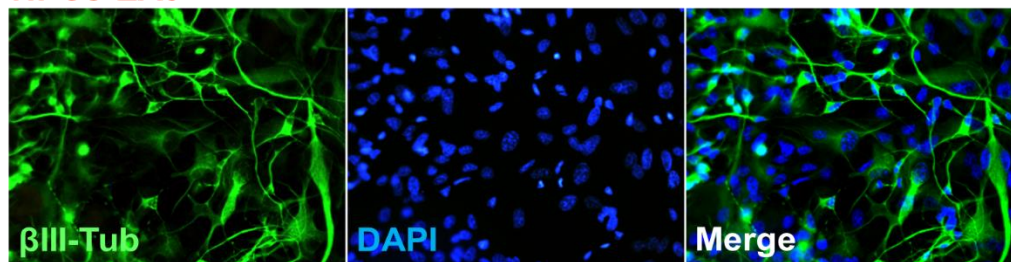


**Figura 27. Cultivo de NPCs-iPSCs afectados con la EA y controles.** Las células se cultivaron en Medio Neurobasal + B27 + EGF + bFGF + LIF. Las 6 líneas celulares (3 afectadas y 3 controles) muestran morfología similar a la de las neuronas y a precursores neurales. Las imágenes se obtuvieron de los pases de cultivo 5 a 10, aumento total 200x. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

### NPCs-NA8

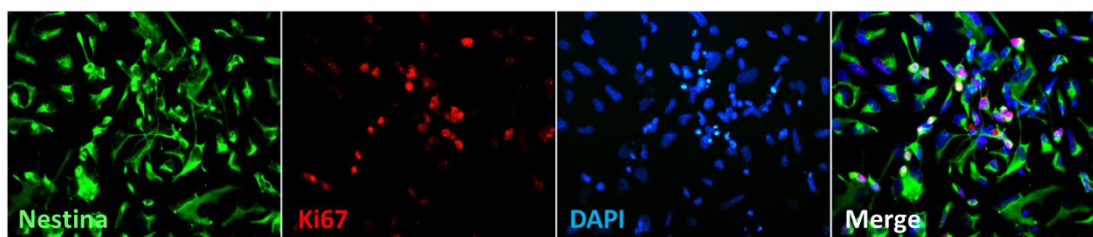


### NPCs-EA3

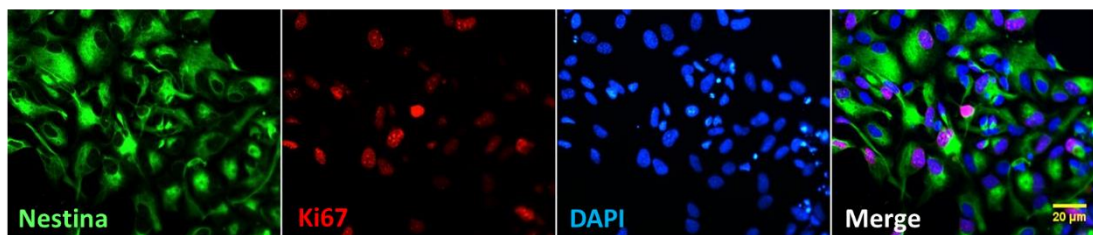


**Figura 28. Expresión de  $\beta$ III-Tubulina en NPCs-EA3, con mutación en PS1 (M146L), y NPCs-NA8 control.** La expresión de la proteína  $\beta$ III-Tubulina (verde) se evaluó por inmunofluorescencia. Las imágenes se obtuvieron de los pases de cultivo 5 a 10, con aumento total 400X, y son representativas de 3 determinaciones. La barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m.

### NPCs-NA8



### NPCs-EA3



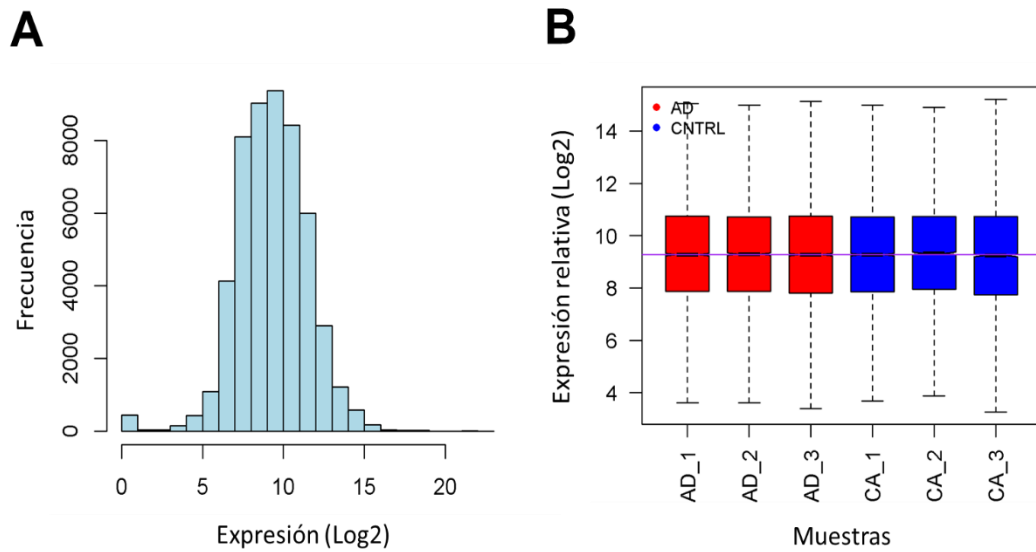
**Figura 29. Expresión de las proteínas Nestina y KI67 en NPCS-EA3 con mutación en PS1 (M146L) y NPCS-NA8 control.** La expresión de Nestina (verde) y Ki67 (rojo) se evaluó por inmunofluorescencia. Las imágenes se obtuvieron de los pases de cultivo 5 a 10, con aumento total 400X y son representativas de 3 determinaciones. La barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m.

## **8.5. RNA-seq de NPCs-iPSCs derivados de pacientes afectados con la EA familiar y controles**

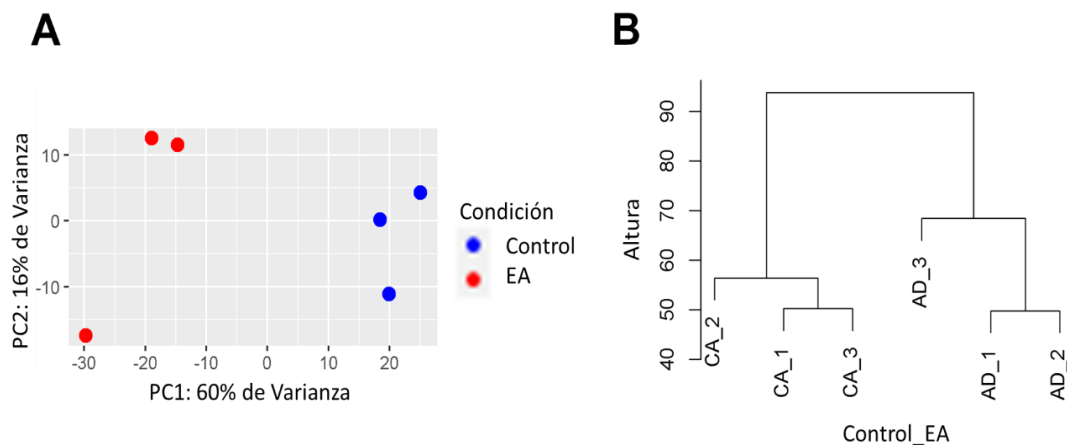
Los datos de la cuantificación de las lecturas de genes derivado de la RNA-seq de las muestras de NPCs-iPSCs tanto de individuos afectados con la EA familiar dado por mutación en PS1 y controles (se secuenciaron muestras de 3 individuos con la EA familiar y 3 controles), se procesaron para analizar las diferencias transcriptómicas. El análisis mostró una distribución normal en el nivel de expresión y una mediana similar en todas las muestras. Lo anterior indicó que el proceso metodológico de la secuenciación del RNA-seq de las 6 muestras era adecuado para un análisis estadístico de comparación de DEG entre el grupo afectado y el grupo control (Figura 30).

Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y dendograma para comparar el patrón de las muestras de pacientes y los controles. Los resultados del PCA muestran que el primer componente principal presenta una variación entre ambos grupos del 60%, y el segundo componente una variación del 16% entre los individuos, indicando que los perfiles transcripcionales de cada grupo (NPCs-iPSCs de pacientes afectados con la EA y controles) difieren entre sí, observado como la agrupación de los puntos de color. Además, las relaciones de agrupación del dendograma indican que las tres líneas de NPCs con mutación en PS1 se agrupan en categorías diferentes a las de las células controles (Figura 31).

El DEA para evaluar las diferencias en el perfil transcripcional entre el grupo afectado con la EA y el control mostró 907 genes expresados diferencialmente entre las NPCs-iPSCs de pacientes con mutación en PS1 y los controles (Figura 32). Los resultados mostraron 374 DEG regulados negativamente y 532 regulados positivamente (Figuras 32 y 33).



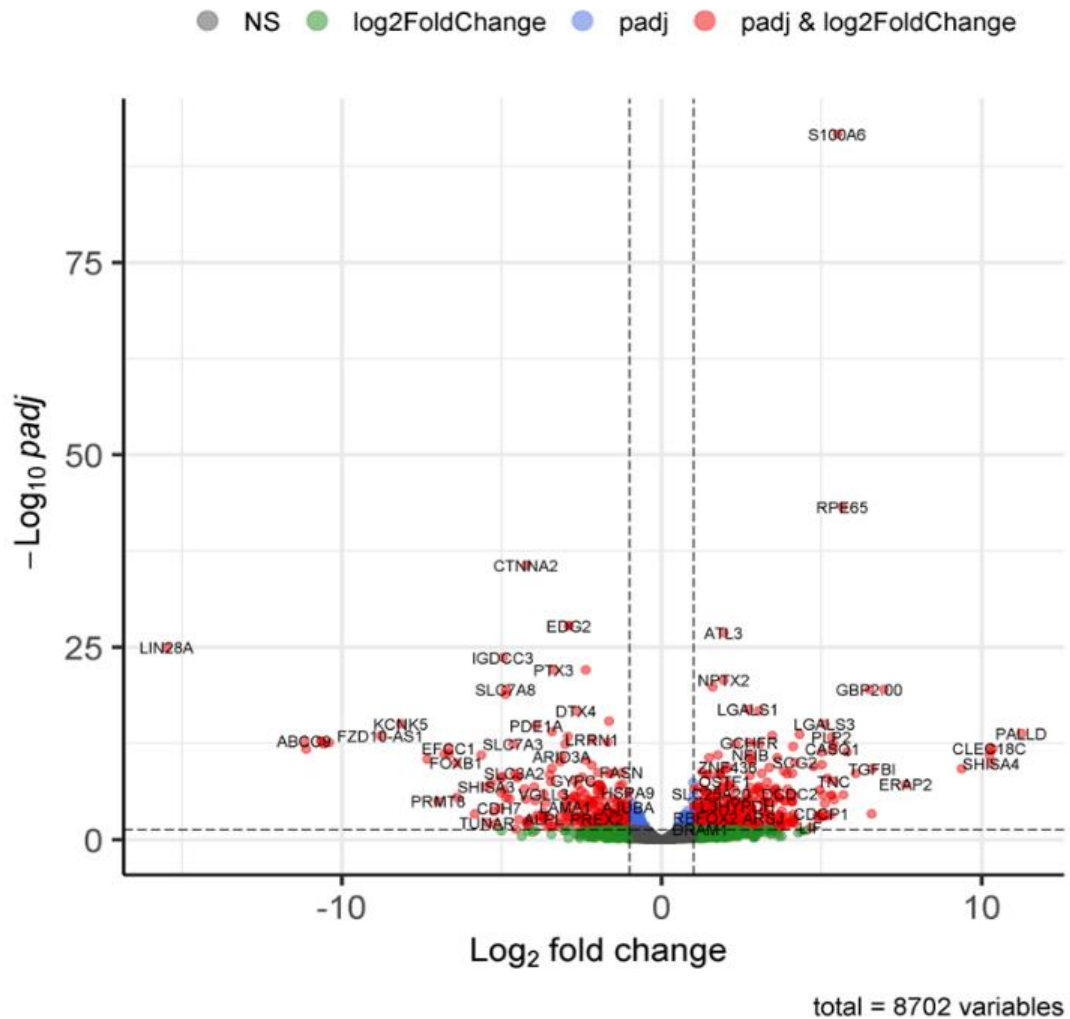
**Figura 30. Normalización de datos de expresión derivados de RNA-seq a partir de NPCs de pacientes con Alzheimer y controles. A.** Histograma de distribución de la expresión en escala logarítmica después del procesamiento de los datos. **B.** Diagramas de Tukey con distribución del valor de la expresión en escala logarítmica de cada sujeto en ambos grupos (CA, Control; AD, Enfermedad de Alzheimer Familiar-PS1).



**Figura 31. Agrupación de perfiles transcripcionales de las NPCs de pacientes con la EA y controles. A.** Gráfico de análisis de componentes principales (PCA) de los datos procesados (Azul, Control; EA, Rojo). **B.** Dendrograma de categorización de los datos de expresión (CA, Control Alzheimer; AD, Enfermedad de Alzheimer Familiar-PS1).

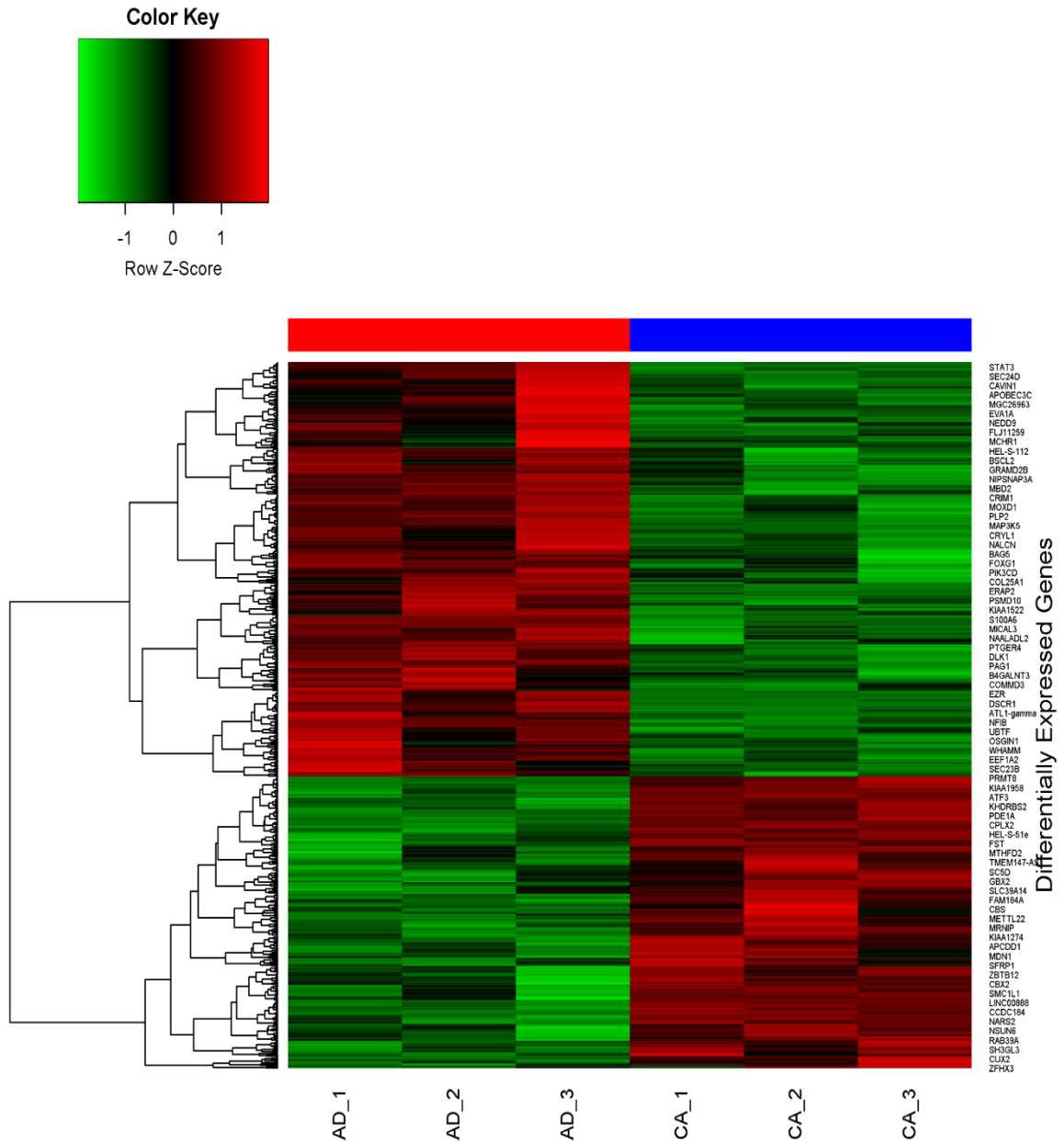
## Volcano plot

EnhancedVolcano



**Figura 32. Gráfico de volcán de los genes expresados diferencialmente (DEG), regulados a la alza y a la baja al comparar muestras de NPCs-iPSCs de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) y muestras control . Los genes con cambio no significativo se definen por valores  $-1 >$  valor de cambio  $< 1$  (puntos verdes), y los genes con cambio significativo con valores  $1 >$  valor de cambio  $< 1$  y valor de p ajustado (adj.P.val)  $< 0.05$  (puntos rojos).**





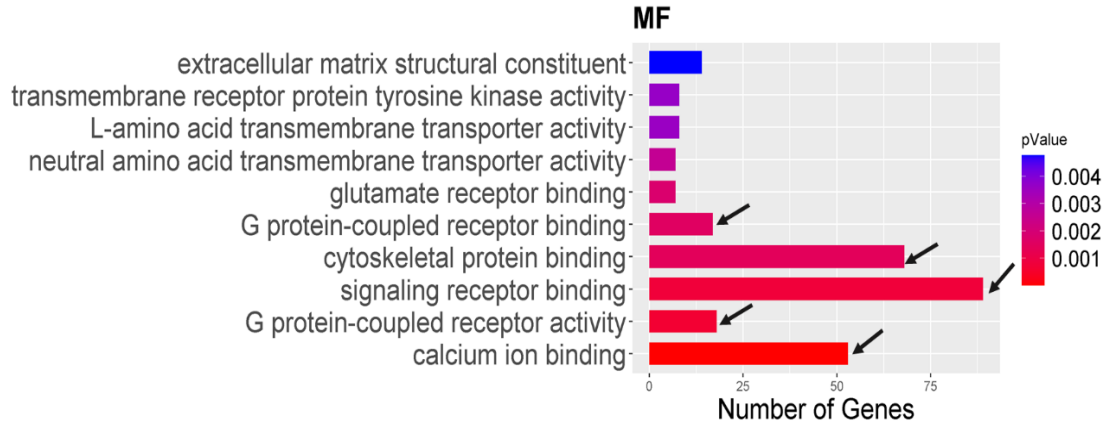
**Figura 33. Mapa de calor de la expresión de DEG (escala logarítmica) en muestras de pacientes con la EA e individuos controles. Se indica el agrupamiento jerárquico del perfil de expresión génica de las NPCs-iPSCs; en color rojo los genes expresados a la alza y en verde los genes expresados a la baja. Las muestras de los pacientes se señalan con las barras en color rojo para la EA y en azul para los controles.**

Dado el gran número de DEG regulados a la alza y a la baja, se determinó si estos genes sobre-representaban alguna función molecular o componente celular, con base en un análisis de enriquecimiento funcional (FEA).

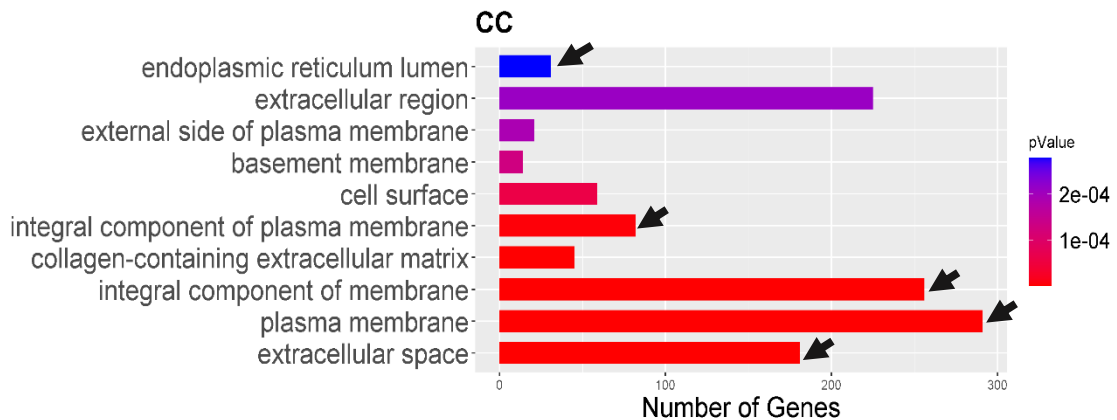
En el caso de la función molecular, los datos expresados diferencialmente de las NPCs derivadas de pacientes con la EA mostraron funciones de unión al ion calcio, actividad de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), unión a receptores de señalización, unión a proteínas de citoesqueleto, unión a GPCRs, unión a receptores de glutamato, actividad del transportador transmembranal de aminoácidos neutros, actividad del transportador transmembranal de L-aminoácidos, actividad de receptores transmembranales con actividad de cinasas de Tirosina y componente estructural de la matriz extracelular (Figura 34).

Con respecto a los componentes celulares enriquecidos, para los DEG en las NPCs con mutación en PS1, los procesos enriquecidos fueron: espacio extracelular, membrana plasmática, componentes integrales de membrana, elementos de matriz extracelular que contienen colágeno, componentes integrales de membrana plasmática, superficie celular, membrana basal, lado externo de membrana plasmática, región extracelular y lumen de retículo endoplásmico (Figura 35).

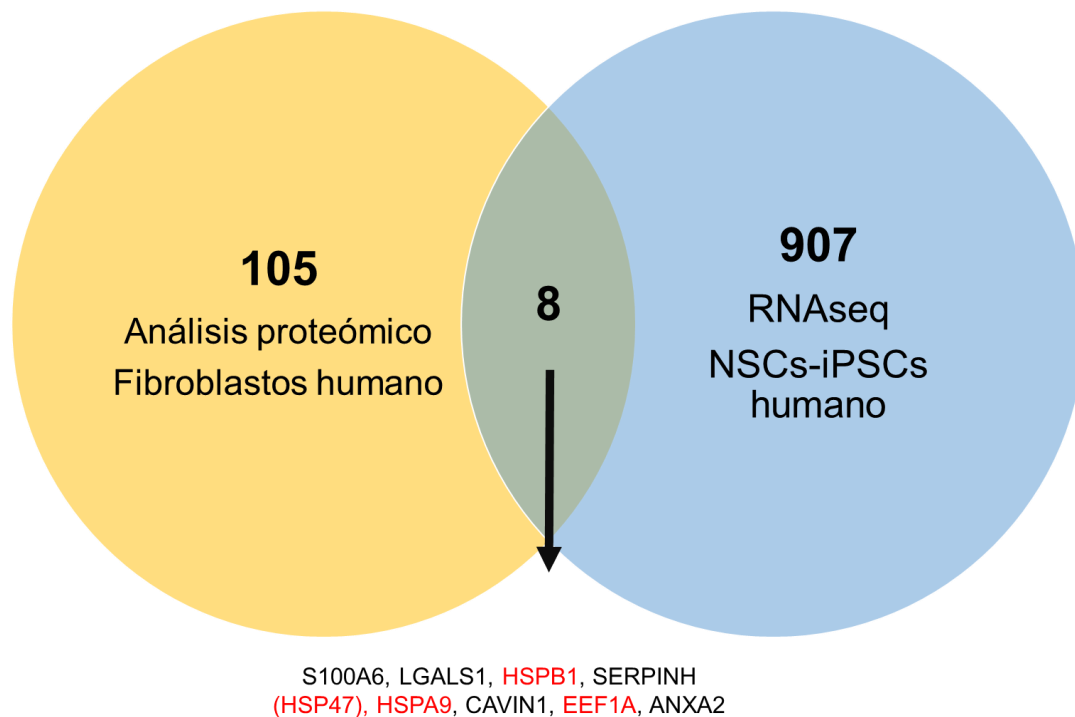
Se realizó una intersección de proteínas y genes entre los datos del perfil proteómico de los fibroblastos periféricos de los pacientes con la EA y los DEG de las NPCs-iPSCs, dado el interés en identificar posibles marcadores asociados a neurodegeneración compartidos entre las células fibroblásticas y las NPCs-iPSCs como representantes del sistema nervioso central. Se identificaron genes de interés en común (compartidos entre las células fibroblásticas afectadas con mutación en PS1 y las NPCs afectadas con mutación en PS1) que corresponden a las proteínas S100A6, LGALS1, HSPB1, SERPINH, HSPA9,CAVIN1, EEF1A y ANXA2 (Figura 36).



**Figura 34. Análisis de la ontología génica de función molecular de los genes expresados diferencialmente en las NPCs afectadas con la EA y controles.** Se muestran las 10 principales funciones moleculares significativas de los DEG respecto al transcriptoma completo de las NPCs. Los diagramas de barras muestran los términos GO más enriquecidos con un valor de  $p < 0.05$ . La escala de colores representa el valor de  $p$  (ver escala), y el eje X indica el número de genes en cada término GO.



**Figura 35. Análisis de la ontología génica de componente celular de los genes expresados diferencialmente en las NPCs afectadas con la EA y controles.** Se muestran los 10 principales componentes celulares significativos de los DEG con respecto al transcriptoma completo de las NPCs. Los diagramas de barras muestran los términos GO más enriquecidos con un valor de  $p < 0.05$ . La escala de colores representa el valor de  $p$  (ver escala), y el eje X indica el número de genes en cada término GO.



**Figura 36. Superposición de DEG en muestras de NPCs-iPSCs de pacientes con mutación en PS1 (EA familiar) y el perfil proteico de fibroblastos dérmicos de pacientes afectados con mutación en PS1 (EA familiar).** Diagrama de Venn de la superposición entre los genes identificados en el análisis de expresión diferencial (DEG; NPCs-iPSCs, color azul) y las proteínas expresadas en los fibroblastos periféricos de pacientes con la EA (fibroblastos humanos; color amarillo), (proteína de estrés reticular; color rojo).

## 9. Discusión

### 9.1 Modelo de células periféricas (fibroblastos de pacientes con la EA familiar-PS1 y controles)

En esta tesis, se muestra que los fibroblastos con mutaciones en PS1 (A246E o M146L) presentan alteraciones en proteínas de la vía autofágica-lisosomal, sobre-expresión de las proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70, así como aumento de la expresión o actividad de cinasas implicadas en la fosforilación de la proteína tau.

Los cambios en las proteínas de la vía autofágica-lisosomal se encuentran entre las primeras alteraciones observadas en un cerebro con la EA (Nixon et al., 2005). En este estudio encontramos expresión diferencial de los principales componentes lisosomales y de autofagia. Previamente, se había reportado una acumulación extensa de vacuolas autofágicas en las neuritas y las terminales sinápticas en la EA, lo que evidencia un deterioro en el flujo de autofagia, ya sea debido a la hiperinducción de la misma o a una reducción del recambio de las vacuolas autofágicas (Sanchez-Varo et al., 2012).

Aquí, se detectó una mayor expresión de los marcadores de autofagia LC3II, LAMP2 y Catepsina D, en células de fibroblastos de pacientes con la EA familiar. La cadena ligera de la proteína asociada a microtubos 3 (LC3II), es un homólogo de los mamíferos de la proteína de la levadura Atg8, y se ha utilizado como marcador específico de la vía autofágica. Al inducirse la autofagia, LC3 se conjuga con fosfatidiletanolamina y se dirige a las membranas de los autofagosomas, por lo que una mayor expresión de LC3II representa una mayor actividad de la autofagia (Tanida et al., 2008). No obstante, debe considerarse que las alteraciones de la autofagia en muestras de la piel podrían no ser biomarcadores específicos de la EA, ya que la autofagia también está alterada en enfermedades de la piel y otras condiciones patológicas (Klapan et al., 2022), por lo que debe combinarse con otros criterios diagnósticos, como la detección de hiperfosforilación de la proteína tau y otros datos clínicos.

Se estima que las proteínas de membrana 1 y 2 asociadas al lisosoma (LAMP1 y LAMP2) contribuyen con aproximadamente el 50 % de todas las proteínas de la membrana del lisosoma, y mantienen la integridad estructural del compartimento lisosomal. En los fibroblastos embrionarios, la delección de LAMP1 y 2 se asocia con una mayor acumulación de vacuolas autofágicas y de colesterol no esterificado, mientras que las tasas de degradación de proteínas no se ven afectadas (Eskelinen, 2006). Los niveles de proteína de LAMP1 y LAMP2 aumentan en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la EA, junto con los marcadores de la vía lisosomal (LC3, Rab3, Rab7 y EEA1), y el aumento en los niveles de LAMP2 en el LCR se correlaciona con el biomarcador temprano de la EA ptau<sup>181</sup> (fosforilación de la proteína tau en el residuo Treonina<sup>181</sup> (Armstrong et al., 2014). Entre otros biomarcadores de fosforilación de tau, los biomarcadores ptau<sup>217</sup> y ptau<sup>181</sup> poseen el poder diagnóstico más alto para discriminar entre demencias con y sin EA en una etapa temprana (Palmqvist et al., 2020; Struyfs et al., 2015). Así, la elevación de LAMP2 en el LCR podría ser una útil alternativa a ptau<sup>181</sup>, y probablemente ptau<sup>217</sup>, para el diagnóstico temprano de la EA.

Por lo anterior, nuestros hallazgos de aumento en la expresión de las proteínas de la vía autofágica-lisosomal, expresión elevada de HSP, fosforilación aumentada de cinasas vinculadas al aumento de la fosforilación de tau, podrían estar asociados con función alterada de PS1 debido al incremento en el procesamiento de A $\beta$ PP a través del complejo  $\gamma$ -secretasa, ya que las mutaciones en el gen PS1 aceleran la progresión de la enfermedad (Borchelt et al., 1997; De Strooper, 2007), al comprometer las funciones normales de las proteínas, como el tráfico intracelular de A $\beta$ PP, lo que podría conducir a un aumento del procesamiento de A $\beta$ PP y al posterior incremento de las formas oligoméricas y el contenido intracelular de la proteína, y potencialmente inducir patología mediada por la proteína tau como se ha reportado para modelos celulares y murinos de la EA (Gómez-Isla et al., 1999; Gómez-Isla et al., 1997)

En este estudio, los fibroblastos de pacientes con la EA familiar mostraron una expresión elevada de los marcadores LC3II, LAMP2 y CatD (Figura 18), lo que probablemente refleja las alteraciones en la vía lisosomal autofágica descritas en modelos de células neuronales y ratones transgénicos con mutaciones en la PS1, debido a la acumulación progresiva de vacuolas autofágicas y deficiencias lisosomales (Lee et al., 2010; Martín-Maestro et al., 2017; Neely et al., 2011; Siman et al., 2000). En este sentido, Lee et al. (2010) destacaron la función de la PS1 en la regulación de la autofagia; este mecanismo de reciclamiento de componentes celulares, la acidificación y la proteólisis lisosomal requieren de PS1 y se interrumpen por mutaciones de la PS1 relacionadas con la EA familiar, debido a un deterioro selectivo de la acidificación del autolisosoma y la activación de las catepsinas. Además, PS1 participa en el direccionamiento de la subunidad de la v-ATPasa a los lisosomas, lo cual es esencial en la acidificación lisosomal. En acuerdo con nuestros resultados, este grupo también encontró que las mutaciones de PS1 que causan la EA familiar de inicio temprano producen un fenotipo lisosomal/autofágico similar en los fibroblastos de los pacientes con la EA como ocurre en las neuronas de dichos pacientes.

Está establecido que la forma escindida de PS1, conocida como la subunidad catalítica del complejo enzimático  $\gamma$ -secretasa, está involucrada en la escisión intramembranal de proteínas de membrana tipo 1 como A $\beta$ PP y Notch, entre otras funciones. Algunas mutaciones en PS1 conducen a una mayor acumulación del péptido A $\beta$ , pero mutaciones diferentes afectan otros aspectos funcionales como la adhesión celular, la apoptosis, el crecimiento de neuritas, la homeostasis del calcio, la plasticidad sináptica y la regulación de la vía autofagia-lisosomal (Shen y Kelleher, 2007).

Aunque la delección de la PS1 afecta la proteólisis de la autofagia, el aumento en las vesículas positivas para LC3II sugiere que no se alteraron los aspectos principales de la macroautofagia, incluyendo la regulación de mTOR dependiente de nutrientes, la generación de autofagosomas, la degradación

del sustrato de la autofagia p62 y la fusión de autofagosomas con lisosomas, siendo independiente de la acidificación del autofagolisosoma (Lee et al., 2010). En este trabajo encontramos que los fibroblastos de pacientes con la EA familiar con PS1 mutada presentan un claro aumento en la formación de autofagosomas, altamente probable que la degradación de su carga se vea afectada debido a la falta de acidificación correcta.

La EA familiar está ligada a mutaciones no solo en PS1, sino también a los genes que codifican para A $\beta$ PP y PS2, lo que conduce a alteraciones en el procesamiento de A $\beta$ PP, generación del péptido amiloide- $\beta$  e hiperfosforilación de la proteína tau. Los modelos animales de la EA familiar con mutaciones en PS1 muestran modificaciones moleculares, bioquímicas y fisiológicas que incluyen alteraciones de la memoria (Elder et al., 2010; Lee et al., 2010; Mirnics et al., 2008; Sun et al., 2005), reducción de la supervivencia (Veeraraghavalu et al., 2013; Wen et al., 2004), deterioro de la función sináptica (Auffret et al., 2009; Ho y Shen, 2011; Priller et al., 2007), alteraciones en el procesamiento de A $\beta$ PP, aumento de los niveles de A $\beta$  (Arber et al., 2020; Yu et al., 2001) y aumento de la fosforilación de tau (A. Ochalek et al., 2017; Pigino et al., 2001; Shepherd et al., 2004; Tanemura et al., 2006), que en conjunto conducen a la neurodegeneración (Armstrong et al., 2014; Cacace et al., 2016; Chui et al., 1999; Eskelinen, 2006; Klapan et al., 2022; Maarouf et al., 2008; Nixon et al., 2005; Palmqvist et al., 2020; Struyfs et al., 2015).

El trabajo de Antonell y colaboradores (2013) fue la base de nuestro análisis bioinformático comparativo de la expresión génica diferencial empleando *fold change* y *adj.P value*, y en este estudio se utilizaron muestras de cerebro de pacientes con la EA familiar con tres mutaciones en la PS1 diferentes, M139T, V89L o E120G. Varios autores estudian muestras de tejidos o células con diferentes mutaciones de PS1 ya que el dato fundamental es el cambio en la función de PS1 que comparten (Martín-Maestro et al., 2017; Piccini et al., 2004; Sproul et al., 2014), y que no se debe a una mutación particular.



Dado el papel de la proteína tau en el tráfico y la maduración de los autofagosomas, la disfunción autofágica puede estar relacionada con la hiperfosforilación de la proteína tau, así como con eventos de oligomerización y truncamiento de proteínas, que conducen a alteraciones en el flujo autofágico-lisosomal (Liu et al., 2015; Zheng et al., 2012). La vía lisosomal es fundamental en la eliminación de los autofagosomas que contienen el péptido A $\beta$ , se ha observado que en las etapas avanzadas de la EA existen niveles aumentados de LAMP2 y CatD que indican fallos en la vía de degradación lisosomal (Hoffman et al., 1998; Saïdo y Leissring, 2012; Söïlvander et al., 2016; Whyte et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, en células de fibroblastos de ratones *knockout* con delección del gene de la PS1, la proteólisis dependiente de lisosomas está comprometida, con niveles anormalmente altos de sustratos de autofagia como p62 y LC3II (Lee et al., 2010; Martín-Maestro et al., 2017). La disfunción de las vías endocítica y lisosomal se encuentra entre los eventos primarios de la EA, y los pacientes muestran alteraciones en la red endolisosomal en varias regiones del cerebro en respuesta al daño local inducido por agregaciones de A $\beta$  o la proteína tau (Penke et al., 2018). En este estudio encontramos que los niveles de la forma completa de A $\beta$ PP no se alteraron en los fibroblastos con la EA familiar (Figura 20), como se reportó anteriormente para modelos neuronales derivados de la reprogramación de fibroblastos con una mutación en PS1, aunque la forma  $\beta$ CTF de A $\beta$ PP aumenta en neuronas con mutaciones en PS1 conllevando a una mayor expresión de marcadores de la vía autofágica-lisosomal, la cual queda por ser detectada en el presente modelo de estudio (Hung y Livesey, 2018).

Varios autores (Hung y Livesey, 2018; Piccini et al., 2004; Sproul et al., 2014) han evaluado los cambios en el procesamiento de A $\beta$ PP en células neuronales humanas reprogramadas a partir de fibroblastos mutados con la EA familiar-PS1, pero no específicamente en células de fibroblastos, por lo que evaluar la presencia de productos proteolíticos de A $\beta$ PP en fibroblastos derivados de

pacientes contribuirá a validar el posible uso de células de fibroblastos de piel en el diagnóstico de la EA familiar.

En conjunto, las observaciones de este trabajo que incluyen la pérdida de la expresión de proteínas claves de la vía autofágica-lisosomal en células somáticas, la presencia de HSP, y la fosforilación aumentada de cinasas vinculadas a su vez a la hiperfosforilación de la proteína tau, podrían ser consecuencia de las mutaciones en el gen de la PS1 que se conoce aceleran la progresión de la EA (Borchelt et al., 1997; De Strooper, 2007). Estas mutaciones comprometen las funciones normales de la proteína, muy probablemente en relación con el tráfico intracelular de A $\beta$ PP, lo que podría conducir a un procesamiento aumentado de A $\beta$ PP y el incremento posterior de las formas oligoméricas y del contenido intracelular de proteínas, como se reportó anteriormente para células en cultivo y modelos murinos de la EA (Gómez-Isla et al., 1999; Gómez-Isla et al., 1997).

La proteína tau de unión a microtúbulos se puede fosforilar, metilar, acetilar, glicosilar, nitrar, sumoilar y truncar, entre otras modificaciones postraduccionales (PTMs). La agregación de tau y la generación de marañas neurofibrilares, que son un sello distintivo de la EA, están vinculadas a PTMs como la hiperfosforilación. En este trabajo se detectaron fosforilaciones de la proteína tau en los residuos Treonina<sup>231</sup>, Serina<sup>396</sup> y Serina<sup>404</sup>, fosforilaciones vinculadas a la EA. La fosforilación de la proteína tau en la Treonina<sup>231</sup>, en conjunto con fosforilaciones en la Treonina<sup>181</sup> y la Treonina<sup>217</sup> se consideran biomarcadores precoces de la EA, detectándose niveles elevados en el LCR de los pacientes con la EA de manera temprana en el *continuum* de la enfermedad, cuando solo se detectan cambios sutiles en la patología del A $\beta$  (Luna-Muñoz et al., 2007).

La fosforilación en la Treonina<sup>231</sup> se encuentra en la región media de la secuencia de la proteína tau, mientras que las fosforilaciones en la Serina<sup>396</sup> y la Serina<sup>404</sup> están ubicadas en la región C-terminal. La fosforilación en el carboxilo terminal puede estar entre los eventos intermedios de las PTMs de

la proteína tau, y coincide con la progresión de marañas neurofibrilares intracelulares a marañas extracelulares (Augustinack et al., 2002; Mondragón-Rodríguez et al., 2014). En conjunto, el patrón de fosforilación de la proteína tau en los residuos Treonina<sup>231</sup>, Serina<sup>396</sup> y Serina<sup>404</sup> confirma la presencia de PTMs de avance temprano a medio, probablemente asociadas a las etapas iniciales del desarrollo de la patología de la EA, desde el pre-NFT hasta el inicio de la generación de NFT intracelulares, ya que nuestro modelo celular corresponde a células de fibroblastos de pacientes con la EA familiar en un paso pre-sintomático (de acuerdo a la información del Instituto Coriell), lo que podría explicar la ausencia de marcadores de estado tardío de la patología de la EA en estas células.

Además, las fosforilaciones de la proteína tau en células no neuronales, como los fibroblastos, pueden ser indicativas de la génesis de la patología de la EA, que hoy en día se considera una enfermedad sistémica en lugar de una enfermedad exclusiva del sistema nervioso central (Kurakin y Bredesen, 2020). De acuerdo con el análisis de biología de sistemas realizado por Karanki y Bredesen en el 2020, la EA puede no ser una enfermedad cerebral sino un trastorno progresivo de la red a nivel del sistema, que es impulsado por el estrés crónico de la red y la falta de homeostasis en todo el organismo. Independientemente de si el estrés crónico, la toxicidad y la inflamación se originan en el cerebro o en la periferia, se comunican al SNC a través de rutas humorales y neurales, dirigiéndose preferentemente a nodos y circuitos reguladores de alta centralidad del sistema nervioso, y eventualmente manifestándose como una enfermedad neurodegenerativa.

La interrupción de la transducción de señales mediada por Akt (también conocida como PKB, proteína cinasa B) y ERK (las cinasas reguladas por señales extracelulares) contribuye significativamente a la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas, como la EA. Estas cinasas regulan la supervivencia celular, la motilidad, la transcripción, el metabolismo y la progresión del ciclo celular. Por lo tanto, las vías de señalización de ERK

y Akt/PKB pueden ser un objetivo terapéutico eficaz para prevenir la progresión de la neurodegeneración (Rai et al., 2019). Las cinasas ERK-1/2, también conocidas como p42/p44 o MAPKs, tienen un papel crítico en la función neural, participando en la proliferación, diferenciación y supervivencia. Las MAPKs son cinasas de proteínas que fosforilan residuos de Serina y Treonina, y promueven una gran diversidad de funciones en muchos tipos de células. Se han descrito tres subfamilias principales de las MAPKs de los mamíferos: las cinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK-1/2), las cinasas c-Jun NH2-terminal (JNK) y las cinasas p38 (Rai et al., 2019). Así mismo, ERK-1/2 y la 3-cinasa de la sintasa de glucógeno (GSK3) (Figura 19), regulan el estado de fosforilación de la proteína tau asociada a microtúbulos (Martin et al., 2013) y el aumento de la transcripción, así como de su actividad enzimática, se encuentran entre los signos de la enfermedad en casos esporádicos y familiares de la EA (Giese, 2009; Hooper et al., 2008; Pei et al., 2002).

En este trabajo se cultivaron fibroblastos de pacientes con la EA familiar en presencia de suero bovino fetal, y a pesar de ello se detectó un aumento en la fosforilación de ERK-1/2 (Figura 19) en comparación con los fibroblastos de individuos aparentemente sanos. Esta fosforilación de ERK-1/2 podría estar asociada a mutaciones en PS1, como se reportó para células somáticas de pacientes con mutaciones en PS1 (Zhao et al., 2002). Se ha descrito aumento de fosfo-ERK en extractos de cerebro de pacientes con la EA (Russo et al., 2002), lo que sugiere un papel en la patogenia de la EA. Además, los depósitos fibrilares anormales de proteínas como tau,  $\alpha$ -sinucleína y A $\beta$ , característicos de los trastornos neurodegenerativos, son blancos citosólicos de las ERK, lo que implica a la vía de las MAPKs (activación crónica de ERK-1/2) en la formación y mantenimiento de tales características patológicas, y por lo tanto en los eventos nocivos que conducen a la neurodegeneración. La activación prolongada de ERK podría también provocar estrés oxidativo por elevación de especies reactivas de oxígeno (Simonian y Coyle, 1996). Sin embargo, se requiere investigación adicional para aclarar los mecanismos subyacentes a

los cambios en la actividad de ERK-1/2 relacionados con la progresión de la EA.

Uno de los sustratos río abajo de Akt es GSK3, a través de las vías de señalización de Akt/PKB. La activación de GSK3 se ha relacionado con la fisiopatología de diversas enfermedades neurodegenerativas, por lo que se ha propuesto la inhibición de esta cinasa como una opción terapéutica para dichas condiciones (Hernández et al., 2009). En los mamíferos, GSK3 está codificada por dos genes, *gsk3 $\alpha$*  y *gsk3 $\beta$* , que codifican las proteínas GSK3 $\alpha$  (51 KDa) y GSK3 $\beta$  (47 KDa). La fosforilación en los residuos Serina<sup>21</sup> (GSK3 $\alpha$ ) o Serina<sup>9</sup> (GSK3 $\beta$ ) podría inhibir la actividad de GSK3, por lo que la desfosforilación de estos residuos podría activar a la GSK3, y las fosfatasas de proteína 2A (PP2A) y 1 (PP1) han sido implicadas en estas desfosforilaciones (King et al., 2006; Planel et al., 2001).

La GSK3 es una cinasa que tiene una función esencial en la EA dada su implicación en la hiperfosforilación de la proteína tau. En este estudio no se observó diferencia en el estado de fosforilación de la GSK3 $\beta$  en el residuo Serina<sup>9</sup> en los fibroblastos de pacientes con la EA familiar, aunque sí una tendencia a fosforilación reducida. Un efecto similar se observó para la Serina<sup>21</sup> de la isoforma GSK3 $\alpha$ , lo que en conjunto sugiere un aumento en la actividad de GSK3 $\alpha$ . Además, los fibroblastos de pacientes con la EA familiar mostraron niveles más altos de GSK3 total, lo cual también sugiere una mayor actividad de esta cinasa (Figura 19).

Se ha descrito que el aumento de la expresión/actividad de GSK3 está asociado con el deterioro de la memoria, el aumento de la producción de A $\beta$  y las respuestas inflamatorias en la EA (Grimes y Jope, 2001; Phiel et al., 2003; Planel et al., 2001; Singh et al., 1995). GSK3 también reduce la síntesis de acetilcolina, lo que es consistente con el déficit colinérgico característico de la EA, y es un mediador crucial de la apoptosis y por lo tanto puede contribuir directamente a la pérdida neuronal (Giese, 2009). GSK3 $\beta$  interactúa con los complejos heterodiméricos de PS1, y las mutaciones de PS1 podrían

desregular las interacciones moleculares y funcionales de PS1 y GSK3 $\beta$  afectando el transporte axonal y la estabilidad de los microtúbulos (Pigino et al., 2003). Además, PS1 puede aproximar a la proteína tau y GSK3 $\beta$ , lo que permite su interacción, en conjunto con las mutaciones de PS1 presentes en la EA familiar que aumentan la capacidad de la proteína para unirse a GSK3 $\beta$ ; en consecuencia, las mutantes de la PS1 conducen a un aumento de fosforilación de la proteína tau (Takashima et al., 1998). Es posible que otros reguladores de GSK3 estén involucrados en la sobre-activación de esta enzima en los fibroblastos con la EA familiar (de acuerdo con la sobre-expresión de GSK3 observada en este trabajo), ya que muchos sustratos de GSK3 requieren una fosforilación previa (*priming*) por parte de otra cinasa (*priming kinase*) en un residuo ubicado cuatro amino ácidos hacia el extremo C-terminal del residuo modificado por GSK3. Entre estas cinasas cebadoras se encuentran PKA, PKC, y la caseína cinasa I CDK5 o PAR1 (Hernández et al., 2009); así, estas cinasas podrían regular la fosforilación de diferentes sustratos por parte de GSK3. Además de la participación de GSK3 en trastornos neurodegenerativos, contribuye al desarrollo de varias enfermedades, como trastornos metabólicos, diabetes e infecciones virales, entre otras; por tanto, los inhibidores de GSK3 podrían corregir el estado de actividad de esta enzima.

Como se mencionó anteriormente, las primeras etapas de la patología cerebral de la EA están asociadas con la fosforilación de la proteína tau en varios residuos como Treonina<sup>231</sup>, Treonina<sup>181</sup> y Treonina<sup>217</sup>, así como con niveles elevados de PHF-1 y la proteína tau total (Figura 20) no solo en el cerebro, sino también en células de tejidos periféricos como la glándula submandibular, el colon sigmoide, el hígado, el cuero cabelludo y la piel abdominal (Dugger et al., 2016), lo que respalda nuestro hallazgo que los fibroblastos con la EA familiar muestran fosforilación de la proteína tau aumentada en estos epítomos, eventos que podrían ser asociados con mutaciones de PS1 que afectan la expresión o actividad de ERK-1/2 y GSK3.

Se considera que numerosas enfermedades neurodegenerativas son causadas por el mal plegamiento de proteínas. Las proteínas de choque térmico, que funcionan principalmente como chaperonas moleculares, desempeñan un papel importante en el plegamiento y el control de calidad de las proteínas, reduciendo el número y el tamaño de las inclusiones y la acumulación de proteínas causantes de enfermedades. De manera relevante, en este estudio se identificó una mayor expresión de HSP (HSP90 y HSP70) en los fibroblastos con la EA familiar-PS1 (Figuras 21, 23, 24), que están involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de las proteínas mediante la regulación del plegamiento y el recambio de proteínas a través de las vías de degradación por el proteasoma o autofágica, relevantes en la EA debido a la acumulación de péptido A $\beta$  y de la proteína tau (Campanella et al., 2018; Dou et al., 2003; Lu et al., 2014; Ou et al., 2014).

La afinidad de la proteína tau por algunas chaperonas moleculares aumenta como resultado de sus alteraciones conformacionales. HSP90 es una chaperona celular clave que forma complejos muy grandes con varias co-chaperonas. Los complejos HSP90 desempeñan una función crítica en la regulación de la calidad de las proteínas y la degradación de las mismas a través de las vías proteasómica y autofágica-lisosomal. Estos complejos HSP90 tienen como sustrato a la proteína tau. Si esta proteína es anómala o está mutada, la proteína CHIP (terminal carboxilo de la proteína que interactúa con HSP70), una co-chaperona activada por E3, se recluta en el complejo, lo que hace que la proteína tau sea ubiquitinada y se activen los mecanismos río abajo que conduce a su degradación por el proteosoma (Salminen et al., 2011).

En este estudio, las células fibroblásticas de pacientes con la EA familiar mostraron aumento de los niveles de HSP, detectados por el análisis de proteómica y validado por inmunodetección de HSP90 y HSP70 (Figura 26); estos datos concuerdan con el aumento del estrés celular inducido por PS1 mutante observado en células somáticas (Calabrese et al., 2006; Piccini et al.,

2004; Wojsiat et al., 2015). Al mantener la fosforilación oxidativa y la funcionalidad de las enzimas de los ácidos tricarboxílicos, los niveles elevados de HSP protegen contra el estrés inducido por el péptido A $\beta$  intracelular durante el procesamiento de A $\beta$ PP (Claudia Campanella et al., 2018; Wilhelmus et al., 2007). La acumulación de HSP también podría indicar que otros factores patógenos están presentes en esta condición patológica (Adachi et al., 2009; Lyon y Milligan, 2019).

Al inducir la expresión de chaperonas, las mutaciones de PS1 también pueden desencadenar la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) en el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias, debido a la acumulación de proteínas mal plegadas, incluido el péptido A $\beta$  y la proteína tau. Inicialmente, la transcripción de chaperonas aumenta para restaurar la homeostasis, pero en la última etapa, sin embargo, la traducción de chaperonas se suprime y su transcripción disminuye (Koren et al., 2009). Se conoce que HSP90 regula a la proteína tau en coordinación con un grupo diverso de co-chaperonas, y la alteración de los niveles de HSP afecta por tanto el destino de la proteína tau y contribuye a la gravedad de la enfermedad. En este sentido, la inhibición de HSP90 disminuye los niveles de la proteína tau soluble e insoluble y de su forma hiperfosforilada (Shelton et al., 2017).

Hsp70 participa en una variedad de actividades de plegamiento, incluido el plegamiento y ensamblaje de proteínas recién generadas, el re-plegamiento de proteínas mal plegadas y agregadas, la translocación a la membrana plasmática de proteínas secretoras y de organelos, y la regulación de la actividad de proteínas reguladoras. HSP70 tiene una función crucial en el proceso de autofagia mediada por chaperonas, mientras que, en presencia de sustratos, HSP70 facilita la unión del sustrato a LAMP2A y promueve la formación del complejo de translocación de la CMA; una vez que el sustrato ha cruzado la membrana, HSP70 media activamente el desmontaje de LAMP2A en formas monoméricas (Bandyopadhyay y Cuervo, 2008; Koga y Cuervo, 2011). El montaje y desmontaje continuos del complejo de



translocación de la CMA garantiza ciclos de unión secuencial y captación de sustratos por esta vía.

Existe una fuerte relación funcional entre la macroautofagia (autofagia no selectiva) y la autofagia mediada por chaperonas mediante la cual los agregados de proteínas citosólicas se transfieren selectivamente a los lisosomas para su degradación. Se ha observado una desregulación de cualquiera de los procesos de la CMA en fibroblastos de pacientes con la EA a nivel de macroautofagia (Cuervo y Wong, 2014), lo que podría explicar la sobre-expresión de chaperonas asociadas a la CMA, como HSP70, reportada aquí (Figura 26), y la alta expresión del receptor de membrana lisosomal LAMP2 (Figura 18), dada la asociación de estas proteínas (H. Wu et al., 2015). La tasa de la CMA también depende directamente del contenido de LAMP2A en la membrana lisosomal, y los niveles de LAMP2A se pueden controlar a través de la regulación positiva transcripcional, como en el caso del estrés oxidativo, o a través de cambios en la tasa de degradación de LAMP2A en la membrana lisosomal, como ocurre cuando la CMA aumenta durante la inanición prolongada (Cuervo y Wong, 2014).

El hallazgo de la sobre-expresión de LAMP2 por los fibroblastos de pacientes con la EA con mutación en la PS1 en este trabajo puede deberse a que el grupo de pacientes de este estudio se encuentra en las primeras etapas de la patología de EA y aún son asintomáticos, y los cambios patológicos podrían estar iniciando y contribuyendo a la sobre-expresión de LAMP2A como mecanismo compensatorio. Además, y como se ha mencionado, la concentración de LAMP2 se eleva significativamente en el LCR de pacientes con EA (Armstrong et al., 2014). Las mutaciones en PS1 conducen a una mayor producción del péptido A $\beta$ , lo que predispone al desarrollo de la EA, con la consiguiente activación de la macroautofagia, mecanismo que promueve la degradación del péptido A $\beta$  y altera la supervivencia celular. Sin embargo, el deterioro de la autofagia puede aliviarse mediante la sobre-expresión de las HSP involucradas en la CMA (Morawe et al., 2012).

Este trabajo se centró en fibroblastos, células periféricas fáciles de aislar, en lugar de muestras neuronales o cerebrales, dada su capacidad comprobada para usarse como modelos de los mecanismos asociados a la patología de la EA. No existe duda del valor del estudio de cerebros *post-mortem*, biopsias cerebrales, modelos animales humanizados y tejidos extra-neuronales, los cuales han permitido la identificación de cambios celulares y moleculares implicados en la fisiopatología de la EA (Conejero-Goldberg et al., 2011; Drummond y Wisniewski, 2017; Gomez-Nicola y Boche, 2015; Hopperton et al., 2018; Joachim et al., 1988; LaFerla y Green, 2012; Leinonen et al., 2010), pero estos enfoques requieren tejido *post mortem*, formas invasivas de obtención de las muestras, y poseen limitaciones éticas así como el uso de otras especies, mediante la sobre-expresión de proteínas, a desarrollar un proceso similar como modelo de una enfermedad de los seres humanos.

En nuestro trabajo, realizado en fibroblastos de piel, se basó en la hipótesis que la EA es un trastorno sistémico que, a la par del daño cerebral característico, afecta a otros órganos del cuerpo (François et al., 2014; Kurakin y Bredesen, 2020; Trushina, 2019). Además, los fibroblastos de piel humana se han utilizado para dilucidar mecanismos moleculares y bioquímicos de patologías relacionadas con errores metabólicos congénitos vinculados a enfermedades neurológicas y para generar neuronas a partir de células troncales pluripotentes inducidas (Ambrosi et al., 2014; Auburger et al., 2012; Bahmad et al., 2017; Beh et al., 2020; Pérez et al., 2017). Por lo tanto, los fibroblastos representan un modelo promisorio para el estudio de enfermedades genéticas neurológicas con inicio clínico tardío como la EA familiar, ya que estas células contienen la información genética del organismo del que se originan y han estado expuestas a las mismas condiciones de estrés ambiental (incluidos los mecanismos epigenéticos).

Se han identificado alteraciones moleculares, metabólicas y bioquímicas en fibroblastos de piel de pacientes con EA (Lee et al., 2010; Pérez et al., 2017; Peterson y Goldman, 1986; Sims et al., 1985; Sorbi et al., 1995), y el

procesamiento de A $\beta$ PP y el depósito de A $\beta$  ocurren en tejidos no neurales, lo que respalda que la EA no se limita al cerebro, y por lo tanto estos hechos fortalecen el uso de células periféricas no neuronales para la investigación de la EA (Puig y Combs, 2013). En consecuencia, estudios previos realizados con células periféricas de pacientes con la EA, como fibroblastos de piel, linfoblastos sanguíneos, plaquetas y células epidérmicas orales, muestran cambios en las vías de señalización relacionadas con la degeneración celular, como la vía lisosomal autofágica (Martin-Maestro et al., 2017), la vía del proteasoma (Muñoz et al., 2008), la inflamación (Trushina, 2019), el metabolismo de los lípidos (François et al., 2014), el estrés celular (Trushina, 2019), el citoesqueleto (Masatoshi et al., 1992), y la supervivencia y proliferación celulares (Hoffmann et al., 2000; Tesco et al., 1992; Uberti et al., 2002).

En el presente estudio, los fibroblastos cultivados de pacientes con la EA familiar e individuos sanos mostraron morfología fusiforme e inmunorreactividad a la proteína Vimentina, un marcador de células mesenquimales (Chang et al., 2002), así como para la proteína SA100A4 (Figura 15), un marcador para el linaje celular fibroblástico (Strutz et al., 1995; Zhang et al., 2013). Además, se evaluó y caracterizó la estabilidad citogenética y cromosómica de las líneas celulares de fibroblastos utilizadas (Figura 16) para descartar anomalías debidas al cultivo prolongado y el alto número de pases, y ninguna de las líneas celulares presentó inestabilidad cromosómica; solo una línea de control presentó una translocación, no relacionada con la EA, previamente reportada por el Coriell Institute (Figura 16). Es importante excluir anomalías cromosómicas en las líneas celulares utilizadas, ya que podrían provocar la fosforilación de histonas y la inestabilidad citogenética, que a su vez modifican la transferencia nuclear de células somáticas, los cambios en la expresión génica y la reprogramación celular (Allahbakhshian-Farsani et al., 2014).

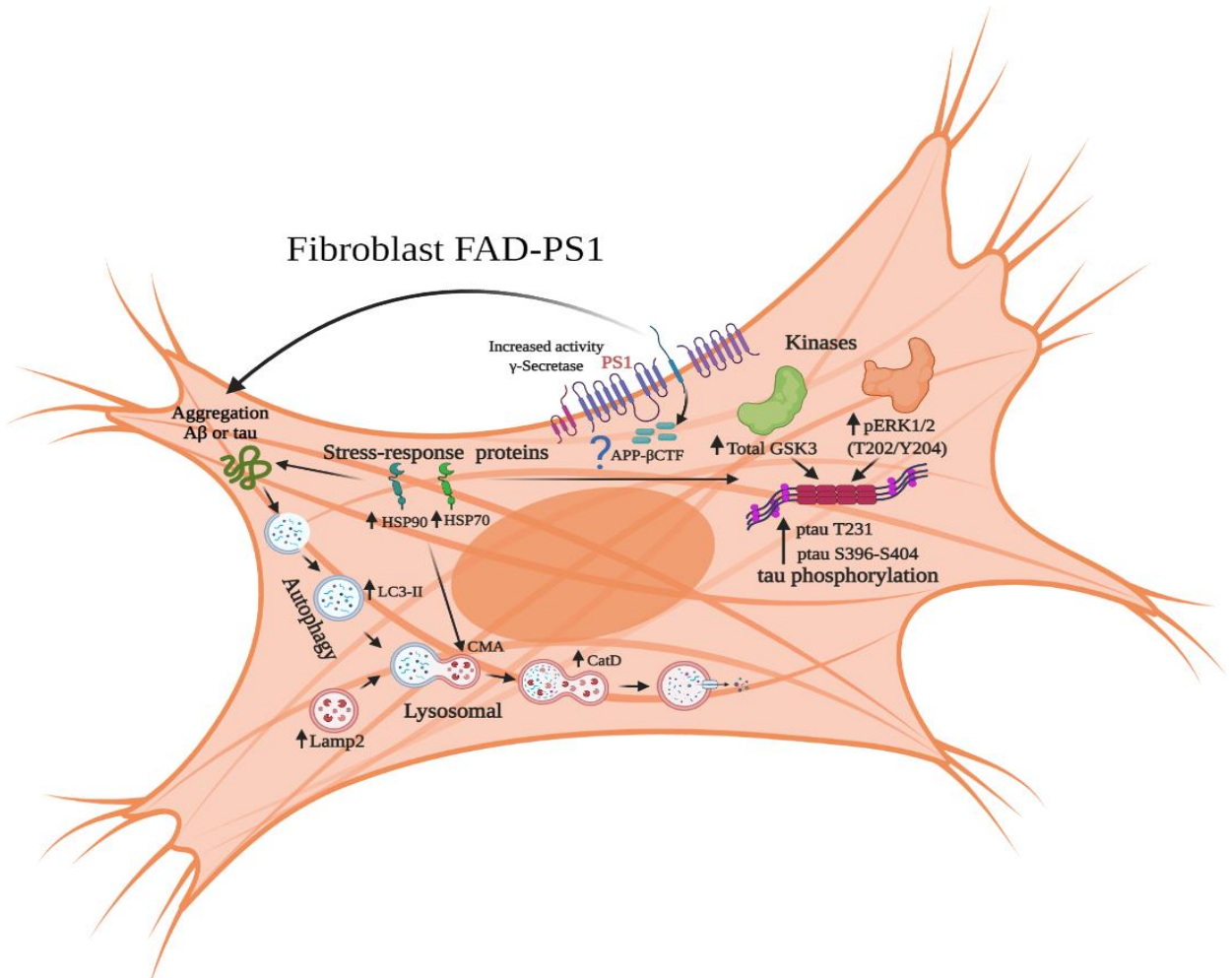
En resumen, nuestros hallazgos indican que los fibroblastos con mutaciones en PS1 (A246E o M146L) muestran alteraciones en la vía autofágica-lisosomal y aumento de la expresión o la actividad de cinasas involucradas en la fosforilación de la proteína tau. Además, nuestro estudio de proteómica identificó una mayor expresión de HSP en el extracto de proteína total de individuos con la EA familiar, y este hallazgo fue validado por inmunodetección en las 6 muestras con la EA familiar (Figuras 26 y 37). Las mutaciones en la EA familiar-PS1 alteran diferentes vías de señalización en células somáticas, lo que podría estar relacionado con la posterior aparición de lesiones histopatológicas en el cerebro, concretamente placas amiloides y marañas neurofibrilares, que podrían estar vinculadas con el deterioro cognitivo característico de esta enfermedad neurodegenerativa.

Por lo anterior, sería relevante investigar los mecanismos por los que las mutaciones de PS1 inducen las alteraciones observadas en los fibroblastos, extendiendo el estudio a otras vías de señalización como la regulación del calcio intracelular, el metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo, identificados en nuestro análisis proteómico.

Los ensayos clínicos de alrededor de 200 candidatos a medicamentos contra la EA mostraron que fueron ineficaces, sugiriendo que el paradigma de la EA existente puede ser insuficiente, lo que impulsó el desarrollo de enfoques alternativos y complementarios que permitan generar nuevas hipótesis para abordar esta compleja enfermedad neurológica. Un aspecto importante es considerar a esta enfermedad no exclusiva del sistema nervioso central, sino también una enfermedad multisistémica, lo que facilitará el diagnóstico y la generación de nuevos y más precisos abordajes terapéuticos. Se conoce que la etapa presintomática de la EA comienza varias décadas antes de la fase clínica, por lo que es urgente desarrollar un diagnóstico más eficiente basado en la identificación de biomarcadores tempranos en tejidos periféricos.

Por lo tanto, los resultados de esta tesis respaldan la posibilidad de identificar cambios asociados a la patología inicial de la EA en las células periféricas que

proporcionan evidencia temprana de alteraciones moleculares antes del inicio de la EA, y que podrían permitir, junto con otros criterios clínicos, el diagnóstico temprano de este importante trastorno neurológico devastador que tiene una gran importancia económica e implicaciones sociales. Los hallazgos de esta tesis, centrada en el modelo de fibroblastos afectados con la EA familiar, se resumen de manera esquemática en la Figura 37.



**Figura 37. Resumen del hallazgo de proteínas asociadas a neurodegeneración en fibroblastos derivados de pacientes con la EA familiar-PS1.** Las proteínas identificadas con cambios de expresión corresponden a la vía autofágica-lisosomal, así como de la fosforilación de cinasas relacionadas a la hiperfosforilación patológica de la proteína tau y vías de estrés celular.

## 9.2 Modelo neural (NPCs-iPSCs EA familiar-PS1 y controles)

Como segundo modelo de estudio de las alteraciones moleculares en la EA se emplearon NPCs derivadas de iPSCs con mutaciones en PS1, las cuales presentan alteraciones en la expresión génica de vías asociadas a señalización de receptores de membrana como los GPCRs, regulación de calcio, moléculas de unión a citoesqueleto, elementos de membrana celular, así como componentes del retículo endoplásmico. Las NPCs de pacientes con la EA familiar e individuos sanos mostraron morfología similar a neuronas (somas pequeños y prolongaciones dendríticas) y a precursores neurales (somas grandes y prolongaciones cortas) (Figura 27) e inmunorreactividad para  $\beta$ III-Tubulina, Nestina y Ki67, marcadores empleados en la caracterización de células precursoras neurales (Figuras 28 y 29) (Anna Ochalek et al., 2017; Sproul et al., 2014).

La identificación de genes expresados diferencialmente en la EA en comparación con los controles dirige el estudio a diferentes direcciones en la detección de nuevos biomarcadores. Mediante el análisis de enriquecimiento funcional, los DEG revelaron la participación en diversos procesos que podrían estar relacionados con la EA (Calabrò et al., 2021; Mizuno et al., 2012). Algunos procesos biológicos (Ontología Génica enriquecida) son relevantes para la enfermedad debido a su relación con la señalización intracelular mediada por GPCRs, moléculas asociadas a microtúbulos, la regulación del ion calcio, moléculas del lumen de retículo endoplásmico y la señalización a través de receptores de membrana.

Los GPCRs (Receptores acoplados a Proteínas G) son proteínas integrales de membrana que las células utilizan para convertir las señales extracelulares en respuestas intracelulares. Todos los GPCRs comparten motivos estructurales comunes como las siete hélices transmembranales conectadas a través de tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. Sin embargo, a pesar de las similitudes estructurales, los GPCRs tienen combinaciones únicas de actividades de transducción de señales que involucran vías de señalización

dependientes e independientes de proteínas G, y regulación compleja (Dorsam y Gutkind, 2007; Katritch et al., 2013; Yang et al., 2021).

Diversos estudios han relacionado a los GPCRs con la EA, en particular evaluando la expresión génica de cerebros post-mortem de pacientes con la EA (Thathiah y De Strooper, 2011). El análisis del perfil de expresión génica de pacientes con la EA con diferente gravedad patológica respecto a controles sanos mostró que los niveles transcripcionales de varios genes de GPCRs cambiaron respecto a individuos controles, específicamente genes de receptores asociados a inflamación, hormonales, y a neurotransmisores y neuromoduladores, como los receptores a: arginina/vasopresina 1<sub>A</sub>, a dopamina D<sub>2</sub>, a glutamato metabotrópico tipo 6, a histamina H<sub>4</sub>, a canabinoides CB<sub>1</sub>, al ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA<sub>B</sub>), a serotonina (5-hidroxitriptamina) y a la hormona paratiroidea (Blalock et al., 2004). La diferente expresión de los GPCRs tendría efectos sobre diversos procesos biológicos, sugiriendo un papel potencial en la progresión patológica de la EA. Los estudios que intentan conectar la patología con los GPCRs señalan que el vínculo podría ser a través de las hipótesis colinérgica, de tau y del A $\beta$  (Thathiah y De Strooper, 2009; Wisely et al., 2014).

El ion calcio es un segundo mensajero importante en la función y la estructura de los circuitos de las células neurales. La señalización mediada por calcio regula múltiples funciones neuronales, como el crecimiento, la exocitosis, la plasticidad sináptica y la función cognitiva. Por lo tanto, las alteraciones en la homeostasis del calcio pueden afectar la estructura y la función normal de las neuronas. Varios estudios han demostrado que la desregulación de la homeostasis del calcio intracelular desempeña un papel importante en la dinámica de la neuropatología de la EA y la pérdida de memoria asociada a la disfunción cognitiva (Kawamoto et al., 2012).

Así, los oligómeros de A $\beta$  pueden estimular la liberación de calcio mediada por proteínas G desde el retículo endoplásmico a través del receptor al 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) (Demuro y Parker, 2013). El retículo endoplásmico

es un organelo que limita activamente el calcio del citoplasma y puede liberar calcio a través del receptor de rianodina o del receptor a  $IP_3$ . La liberación de calcio de los reservorios se asocia con las 2 hipótesis etiológicas de la EA ( $A\beta$  o tau) (Z. Wu et al., 2015). Una disminución del calcio producirá una baja producción de la v-ATPasa debido a la reacción de plegamiento de proteínas que depende de las altas concentraciones de calcio en el retículo endoplásmico, alterando el valor adecuado de pH en los lisosomas y conduciendo a una mala acidificación y función lisosomal (Görlach et al., 2006).

El retículo endoplásmico es un componente importante de la síntesis, modificación y plegamiento de proteínas, y se ha relacionado con la EA a través del estrés del retículo endoplásmico, la acumulación de proteínas mal plegadas y alteraciones en la regulación del calcio. El mal plegamiento y la agregación de proteínas son mecanismos patogénicos comunes de la EA, y la perturbación de la función e integridad del retículo endoplásmico por la acumulación de proteínas mal plegadas en la luz de este organelo da como resultado estrés del retículo endoplásmico. Para evitar esta condición, las células activan cascadas de señalización intracelular adaptativas conocidas como respuesta a proteínas mal plegadas. El estrés del retículo puede ser consecuencia de señalización celular aberrante mediada por receptores de membrana contribuyendo a la neuropatología del  $A\beta$  o de la proteína tau (Paschen y Mengesdorf, 2005; Rao y Bredesen, 2004).

Las mutaciones en la presenilina provocan una mayor liberación de calcio desde el retículo endoplásmico a través de los receptores a  $IP_3$  y a rianodina, de canales de calcio. La elevación anormal del calcio citosólico aumenta la fosforilación de la proteína  $A\beta$ PP y la actividad de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ , resultando en una mayor producción de  $A\beta_{42}$  y de oligómeros de  $A\beta$ , que a su vez promueven aún más la liberación de calcio mediada por el receptor a  $IP_3$  desde el retículo endoplásmico al activar GPCRs que promueven la producción de  $InsP_3$  (Chan et al., 2000; Guo et al., 1996). La disminución



anormal o el agotamiento de los niveles de calcio del retículo dan como resultado la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE y UPR que se puede observar como un aumento de la expresión de proteínas de choque térmico o chaperonas (Chang et al., 2006; Katayama et al., 2001; Wakita et al., 1994).

El aumento temporal de la señalización del calcio intracelular induce un aumento prolongado de la fosforilación de tau a través de la vía de la GSK-3 $\beta$  en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Hartigan y Johnson, 1999), y las neuronas hipocampales y corticales en cultivo e incubadas con la proteína tau muestran un aumento significativo del calcio intracelular debido a la activación de receptores muscarínicos (Gómez-Ramos et al., 2008).

Los resultados del análisis bioinformático del presente trabajo para explorar genes candidato como posibles marcadores, que se encontraron potencialmente involucrados en la patogénesis de la EA entre las células periféricas y el modelo neural, revelaron ocho genes interesantes, que se describen a continuación.

### **S100A6**

Las proteínas S100 son una familia de proteínas con motivo “EF-hand” de unión a calcio, de bajo peso molecular y que se expresan en distintos órganos y tejidos. Están involucrados en múltiples funciones intracelulares, incluidas la proliferación celular, la diferenciación, la fosforilación de proteínas, el ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto y la homeostasis del calcio intracelular (Bresnick et al., 2015). Las proteínas S100 se presentan principalmente como homodímeros, y la unión del calcio desencadena cambios conformacionales que exponen una hendidura hidrofóbica crucial para la interacción con proteínas necesaria para su activación, regulación y señalización (Allgöwer et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, el aumento de calcio citosólico activa proteínas dependientes de calcio que regulan diversos procesos asociados a

la EA. Diferentes proteínas S100 parecen estar involucradas en eventos relacionados con el procesamiento de A $\beta$ PP, lo que influye en los niveles de A $\beta$ , las modificaciones postraduccionales de la proteína tau, la formación de inclusiones de proteínas y múltiples vías de señalización. Tienen la capacidad de actuar como sensores de calcio, regulando la actividad de los canales y bombas involucrados en la liberación o captación de este ion. Además, participan en el control de los niveles de calcio regulando su señalización en la EA (Cristóvão y Gomes, 2019).

El gene que codifica a S100A6 se identificó como clave en la EA, al ser una de las proteínas que correlaciona de forma positiva y altamente significativa con el fenotipo de la EA (Wruck et al., 2016). Al igual que otras proteínas S100, S100A6 está aumentada en pacientes con EA y en modelos de ratones con EA (Leclerc et al., 2010; Weissmann et al., 2016). Además, S100A6 se une al complejo CacyBP/SIP, que participa en la organización de los microtúbulos, y la sobre-expresión de S100A6 en células de neuroblastoma NB2a inhibe la actividad del complejo CacyBP/SIP y, en consecuencia, reduce la tasa de desfosforilación de tau, afectando la estabilidad de los microtúbulos (Filipek y Leśniak, 2020; Wasik et al., 2013).

## **LGALS1**

Las galectinas son lectinas animales que se unen a  $\beta$ -galactósido, con 15 miembros en los mamíferos. Poseen dominios de reconocimiento de carbohidratos que constan de aproximadamente 130 aminoácidos, que contienen siete secuencias de aminoácidos conservadas requeridas para dicho reconocimiento (Yang et al., 2008). Las galectinas son abundantes en el tracto gastrointestinal, el sistema inmunitario y el sistema nervioso (Blanchard et al., 2016), y las galectina-1 y 3 tienen un papel importante en la patogenia de los trastornos neuroinflamatorios y neurodegenerativos, como la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la EA, las enfermedades de Parkinson y Huntington, y la enfermedad priónica. Generalmente, la galectina-

1, 8 y 9 tienen funciones antiinflamatorias y neuroprotectoras (da Rosa et al., 2021).

La neuroinflamación inducida por células gliales se reconoce como una de las principales características de la patología de la EA. Se ha demostrado que la activación de la microglía, la desmielinización, la pérdida axonal y sináptica se ven sustancialmente potenciadas por la ausencia de Gal-1 (Aalinkeel y Mahajan, 2016). Gal-1 interactúa con la microglía a través de su residuo de glicano ligado a galectina-1-N, inactivando así al primero y limitando el proceso de neurodegeneración; además, Gal-1 endógeno o exógeno inhibe la activación microglial a través de la unión de los 2 O-glicanos centrales en CD45, lo que induce el secuestro de glicoproteínas ubicadas en la superficie de las células de la microglia. Esto a su vez inhibe la activación de las vías de señalización de p38-MAPK, CREB y NF- $\kappa$ B, indicando un mecanismo dependiente de la glicosilación por el cual Gal-1 previene la neuroinflamación al inhibir la actividad microglial (Starossom et al., 2012). En el hipocampo Gal-1 contribuye tanto al aprendizaje y a la memoria de forma dependiente así como a la plasticidad del comportamiento a través de mecanismos de señalización neurogénicos o no neurogénicos (Sakaguchi et al., 2011).

### **HSPB1**

La mayoría de las proteínas inducidas por el estrés son chaperonas moleculares y tienen un papel esencial en la biosíntesis, el transporte, la translocación, el plegamiento y el ensamblaje de otras proteínas. En condiciones de estrés, las HSP evitan el mal plegamiento y la oligomerización de las proteínas, y transfieren las proteínas mal plegadas al proteasoma para su degradación (Javid et al., 2007), contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis celular.

HSP27 pertenece a la familia de proteínas de choque térmico pequeñas (sHSP), chaperonas independientes de ATP. La función más importante de las sHSP es la inhibición de la agregación de proteínas incorrectamente plegadas al unirse a proteínas no nativas y mantenerlas en un estado de re-plegamiento.

Además, también tienen actividades antiapoptóticas y antioxidantes y pueden unirse al citoesqueleto de actina y estabilizarlo (Haslbeck y Buchner, 2002; Sun y MacRae, 2005).

Las HSP reducen el estrés oxidativo y median la vía apoptótica, y pueden facilitar la degradación proteasomal, lo que ayudaría a la eliminación de A $\beta$ . Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos de la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  no se conocen por completo. Estos mecanismos son muy diversos y probablemente incluyen el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Tóth et al., 2013). La peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas y ADN son notables en el cerebro de pacientes con EA, y A $\beta$  podría tener un papel central en la inducción de estos procesos (Butterfield et al., 2001). HSP27 tiene un efecto protector en el estrés oxidativo, y por lo tanto, podría reducir la neurotoxicidad de A $\beta$  debido a esta propiedad (Tóth et al., 2013).

Se ha mostrado que la inhibición de la hiperfosforilación de la proteína tau restaura la disfunción neuronal y modifica o retrasa la progresión de la EA, lo que podría ser un objetivo terapéutico para el tratamiento. La formación de fibrillas de tau puede prevenirse *in vitro* por HSP27 recombinante, y los niveles de la proteína tau se redujeron *in vivo* al sobre-expresar HSP27, inhibiendo la formación de fibrillas de tau (Venugopal et al., 2019).

Las HSP aumentan en varias enfermedades neurodegenerativas y pueden proteger las células cerebrales de la lesión por radicales libres, estrés oxidativo y proteínas mal plegadas (Kalmar y Greensmith, 2009). Varios estudios indican que las chaperonas son potentes supresores de la neurodegeneración y, por lo tanto, son dianas terapéuticas promisorias para los trastornos conformacionales de las proteínas (Muchowski y Wacker, 2005).

### **SERPINH1 (HSP47)**

HSP47 es una chaperona molecular específica del procolágeno residente en el retículo endoplásmico que representa un factor esencial en la síntesis de

colágeno. La expresión de HSP47 es altamente específica de los tejidos y las células, y se encuentra predominantemente en todas las células productoras de colágeno con niveles de expresión constitutivos que coinciden con la cantidad de colágeno presente (Tasab et al., 2000).

HSP47 puede interactuar físicamente con A $\beta$ PP, y su patrón de localización intracelular es sensible a los niveles de A $\beta$ PP. Además, HSP47 está enriquecida en las placas amiloides en modelos murinos y pacientes con la EA. La inhibición farmacológica o el silenciamiento génico de HSP47 reduce los niveles de péptidos A $\beta$  extracelulares liberados por líneas celulares que expresan A $\beta$ PP normal o mutante, así como por cultivos neuronales primarios (Bianchi et al., 2011).

### **HSPA9 (HSP70)**

La familia de proteínas HSP70 es una clase de chaperonas muy abundantes y expresadas de forma ubicua que participan en numerosos procesos biológicos, como el tráfico de proteínas, las primeras etapas del plegamiento de polipéptidos nacientes y el re-plegamiento o degradación de productos peptídicos agregados (Lee y Tsai, 2005). HSP70 se compone de dos dominios distintos, un dominio N-terminal de unión a nucleótidos de 40 kDa que regula la asociación con el sustrato y un dominio C-terminal de unión a sustrato de 25 kDa, que reconoce tramos hidrofóbicos expuestos en las primeras etapas de plegamiento de la proteína. Un enlazador hidrofóbico flexible y corto une ambos dominios. La unión y la hidrólisis de ATP se acoplan a cambios alostéricos en HSP70, que influyen en las interacciones proteína-sustrato en el ciclo de la chaperona (Lackie et al., 2017).

Los agregados de A $\beta$  desencadenan una serie de eventos posteriores, como el depósito de placas, la hiperfosforilación de la proteína tau, la inflamación, la pérdida de la estructura y función sináptica, y la muerte de las neuronas susceptibles, que dan lugar a la "hipótesis de la cascada amiloidea" (Hardy y Higgins, 1992). En teoría, HSP70 suprime la agregación de A $\beta$  para impedir el proceso patológico de la EA, y en consecuencia la sobre-expresión de HSP70

inhibe la agregación de A $\beta$  y reduce los síntomas de la enfermedad (Magrané et al., 2004).

HSP70 inhibe directamente la agregación de la proteína tau mediante un mecanismo que implica asociaciones preferenciales con especies de tau solubles, monoméricas y oligoméricas pre-fibrilares (Patterson et al., 2011). HSP70 ayuda a que estas combinaciones sean degradadas por el sistema de ubiquitina-proteasoma y autofagia. HSP70 incluye la forma inducible de HSP70 denominada proteína de choque térmico 72 (HSP72), y una forma expresada constitutivamente denominada proteína de choque térmico 70. HSP72 y HSP70 tienen efectos distintos e incluso opuestos en la función y estabilidad de la proteína tau. HSP72 puede facilitar su degradación, mientras que HSP70 enlentece la eliminación de tau, particularmente después de la desestabilización de los microtúbulos. En modelos celulares, se ha mostrado que los inhibidores de la actividad de ATPasa de HSP70 promueven el recambio de tau y restauran su homeostasis (Jinwal et al., 2009).

La combinación de HSP70/HSP40 y HSP90 induce modificaciones estructurales en los oligómeros de A $\beta$  citosólicos, y se proponen dos mecanismos por los cuales las HSP pueden inhibir la agregación de A $\beta$ . En uno, la chaperona se une al amiloide mal plegado de manera independiente del ATP, evitando que se agregue (Lackie et al., 2017). En el segundo mecanismo, la chaperona puede unirse a A $\beta$  de una manera dependiente de ATP, cambiando la conformación de A $\beta$  a una menos susceptible a la agregación (Morán Luengo et al., 2019). La evidencia acumulada indica que HSP70 tiene actividad de neuroprotección contra varios amiloides intracelulares en modelos de *Drosophila* y ratones (Martín-Peña et al., 2018). HSP70 también se ha asociado con depósitos extracelulares en la EA; HSP70 es normalmente una proteína citosólica y la asociación con los depósitos puede ser consecuencia de la liberación, probablemente por exosomas, para detener la acumulación de ensamblajes proteotóxicos, de acuerdo con los niveles elevados de HSP70 observados en la EA (Rivera et al., 2018).

## CAVIN1

La caveolina 1 es una proteína integral de membrana de 21–24 kDa y es un componente principal de la formación de caveolas a nivel de la membrana celular (Simón et al., 2020). La expresión de caveolina y la formación de caveolas en la superficie celular están reguladas por el contenido de colesterol de la célula. El aumento en los niveles de colesterol aumenta la expresión de caveolina, mientras que el agotamiento del colesterol suprime su producción (Frank et al., 2006).

Se ha reportado que CAVIN1 tiene un papel clave como sensor y modulador de los niveles de colesterol en la membrana, y varias observaciones recientes conectan a la caveolina con la transducción de señales mediante la regulación del colesterol. Un buen ejemplo de esto es la función emergente de la caveolina y el colesterol en el procesamiento proteolítico de la A $\beta$ PP y la generación de A $\beta$ , asociándose con regiones de membrana con alto contenido de colesterol, como las balsas lipídicas o caveolas (Nierzwicki et al., 2021), mientras que la producción de APP $\alpha$  en la vía no amiloidogénica ocurre en regiones de membrana con bajo contenido de colesterol y alta fluidez (Bodovitz y Klein, 1996). Se ha demostrado que caveolina-1 se asocia físicamente con A $\beta$ PP (Ikezu et al., 1998), lo que respalda que las caveolas y la caveolina desempeñen un papel fundamental en la proteólisis de la A $\beta$ PP. Es concebible que una regulación a la alza de la expresión de caveolina-1 en el cerebro de pacientes con la EA podría afectar sinérgicamente la formación de caveolas y la amiloidogénesis, modulando así la patogénesis de la enfermedad.

La pérdida de CAVIN1 en un modelo de ratón transgénico produce una neuropatología similar a la exhibida por la EA; es decir, producción de A $\beta$ , astrogliosis elevada, vasculatura cerebral reducida y pérdida neuronal en el hipocampo (Head et al., 2008). Las vías de señalización en las neuronas se ven gravemente comprometidas con la edad. Específicamente, las moléculas postsinápticas como los receptores a glutamato y neurotrofinas, y las cascadas de señalización favorables a la supervivencia (es decir, la activación de

quinasas y la producción de AMPc) disminuyen significativamente con la edad (Head et al., 2010). Por lo tanto, es posible que la organización y la eficacia de las vías de señalización que producen tolerancia se encuentren severamente limitadas en los cerebros de personas con edad avanzada.

## **EEF1A**

Uno de los factores de traducción de mRNA más abundantes es EEF1A, que desempeña un papel fundamental en la fase de elongación de la síntesis de novo de proteínas. Algunos estudios han establecido firmemente que la síntesis de novo es esencial para el mantenimiento de la plasticidad sináptica a largo plazo y la formación de la memoria (Costa-Mattioli et al., 2009; Tsokas et al., 2005), y hallazgos recientes indican un vínculo entre alteraciones en la síntesis de novo de proteínas y deficiencias de la plasticidad neuronal y la función cognitiva asociadas a la EA (Ma et al., 2013).

EEF1A es una proteína de unión a GTP y es responsable de la entrega de todos los tRNA aminoacilados al ribosoma y, por lo tanto, de la elongación de la cadena polipeptídica (Mateyak y Kinzy, 2010). Junto a otros componentes de la maquinaria de traducción del mRNA, la síntesis de EEF1A está controlado por la vía de mTORC1 (Meyuhas, 2000), y la desregulación de la señalización de mTORC1 se ha implicado en la EA. Esta vía controla la generación de proteínas mediante la regulación de la síntesis de nuevos aparatos de traducción a través de la cinasa p70S6 (p70S6K). En particular, el proceso conduce a la traducción de una clase específica de mRNAs caracterizados por oligopirimidinas en sus regiones 5' no traducidas (UTR). Las proteínas codificadas por dichas transcripciones incluyen proteínas ribosómicas y factores de elongación como EEF1A (Meyuhas, 2000).

En respuesta a diversos tipos de estrés, las células eucariotas forman gránulos de estrés sin membrana (speckels) que contienen una amplia variedad de mRNA y proteínas de unión a mRNA estancados en la traducción en el citoplasma, para suprimir la traducción de proteínas y para controlar el metabolismo y la supervivencia celular. Estos SG parecen ser heterogéneos y



contienen proteínas con varias funciones, incluidas las involucradas en el inicio de la traducción, la maquinaria de degradación del mRNA y otras vías reguladoras del metabolismo del RNA. Muchas proteínas enriquecidas en SG contienen regiones intrínsecamente desordenadas, que no solo facilitan diversas interacciones proteína-proteína y proteína-RNA, sino que también controlan el ensamblaje de SG, y existe evidencia que sugiere que la dinámica de los SG puede contribuir a la neurodegeneración (Liu y Chern, 2021).

## **ANXA2**

Las anexinas constituyen una familia multigénica de proteínas de unión a membrana reguladas por calcio, que se considera organizan la interfaz entre el citoplasma y la cara citoplasmática de las membranas celulares. En los vertebrados, se han identificado 12 subfamilias de anexinas (A1–A11 y A13). La interacción con la membrana dependiente de calcio se produce a través del dominio central de anexina. La región N-terminal precede al dominio central y es diversa en longitud y secuencia entre los diferentes miembros de la familia de anexinas (Gerke y Moss, 2002). Se ha mostrado que ANXA2 y A6 residen en balsas lipídicas y en particular ANXA2 parece estar involucrado en la organización de microdominios ricos en colesterol y en su unión a proteínas del citoesqueleto. En tauopatías como la EA, la proteína tau se redistribuye desde el axón al compartimento somato-dendrítico. Sin embargo, el mecanismo celular que regula la localización de tau sigue sin ser claro, si bien se ha reportado que tau interactúa con ANXA2 de manera dependiente de calcio a través del extremo N-terminal de tau codificado por el primer exón (E1) (Gauthier-Kemper et al., 2018) .

Recientemente se estableció la función de la ANXA2 en los primeros pasos de la autofagia, observado en células dendríticas primarias del sistema inmunitario. La ANXA2 promueve la biogénesis de vesículas ATG16 orquestando el reclutamiento de fosfoinosítidos en las membranas vesiculares y coordinando la gemación vesicular y la fusión homotípica (Morozova et al., 2015), y en células HeLa ANXA2 regula la formación de autofagosomas al

controlar la clasificación y el tráfico de ATG9 desde los endosomas (Moreau et al., 2015).

En la línea de ratones PS1-S367A, la falta de fosforilación de PS1 en Serina<sup>367</sup> impide su unión a ANXA2, y se ha descrito la participación de PS1 en la regulación de la autofagia, en la que la forma desfosforilada de PS1 en la Serina<sup>367</sup> cataliza la formación de A $\beta$ , pero no estimula el flujo autofágico. Por el contrario, la forma fosforilada (Serina<sup>367</sup> de PS1) del complejo  $\gamma$ -secretasa a través de CK1 retiene su actividad catalítica en la formación de A $\beta$ , pero también induce, como efecto dominante, una mayor fusión autofagosoma-lisosoma y la degradación autofágica de  $\beta$ CTF, lo que resulta en una disponibilidad reducida de sustrato para generar A $\beta$  (Bustos et al., 2017).

Resulta interesante que una serie de proteínas específicas de unión al calcio (ANXA2, ANXA5 y FN1) o sensibles al calcio (COL6A3) se enriquezcan diferencialmente en el análisis proteómico de los extractos de pacientes con la EA (Pedrero-Prieto et al., 2019). Este hecho puede estar relacionado con la importancia del calcio en la progresión de la EA, ya que el aumento en el calcio se asocia con una mayor producción de A $\beta$  y también con reducción de la macroautofagia (Penke et al., 2017).

Por último, el análisis bioinformático se ha aplicado a muchas enfermedades en las últimas décadas para identificar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Bang et al., 2022; Baumgartner et al., 2011; Wang y Wang, 2020; Yu et al., 2021). En este estudio se aplicaron modelos de prueba estadísticos a los datos de expresión de genes en la EA para comprender mejor sus mecanismos moleculares específicos y para buscar biomarcadores para pacientes con la enfermedad. Sin embargo, algunas limitaciones del estudio se relacionan con el tamaño de la muestra analizada, que puede haber causado una tasa relativamente alta de resultados falsos positivos o falsos negativos. Además, no se realizó ninguna verificación experimental. Por lo tanto, para verificar los resultados presentados, se requieren más estudios que permitan dilucidar la función biológica de estos

genes en la EA, además de su uso potencial como biomarcadores moleculares de la enfermedad.

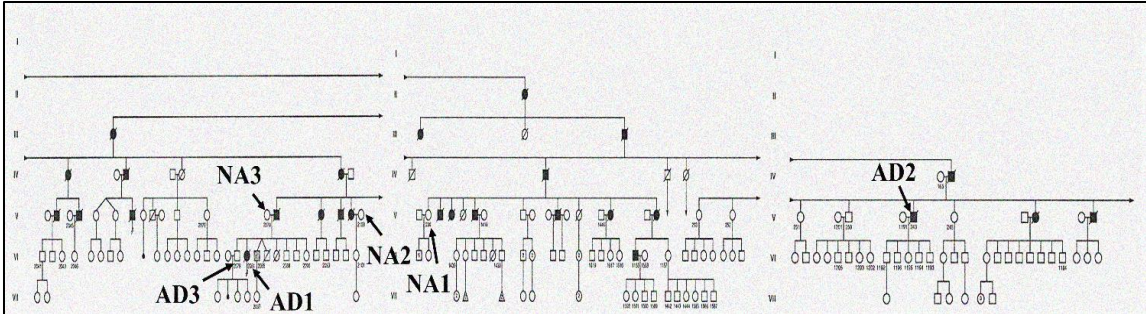
## 10. Conclusiones

1. Los fibroblastos con mutación en PS1 (A246E o M146L) presentan alteraciones de la vía autofágica-lisosomal, y aumento de la expresión o actividad de cinasas implicadas en la fosforilación de la proteína tau, respecto a fibroblastos controles
2. Existe una mayor expresión de HSP en los fibroblastos de individuos afectado por la EA familiar.
3. Las células precursoras neurales derivadas de la reprogramación de células somáticas de pacientes con la EA familiar tienen diferencias en la expresión, de genes asociados a vías moleculares de señalización de GPCRs, moléculas de unión a calcio, elementos de la membrana plasmática y del lumen del retículo endoplásmico, y de unión a citoesqueleto.
4. Existen moléculas con cambios en su expresión compartidas por los fibroblastos y las NPCs-iPSCs de individuos afectados con mutación en la PS1 (S100A6, LGALS1, HSPB1, SERPINH1, HSPA9, CAVIN1, EEF1A y ANXA2), relacionadas con neurodegeneración en la EA.
5. Estos resultados apoyan la posibilidad de identificar cambios en las células periféricas de pacientes con la EA que proporcionen evidencia temprana de alteraciones moleculares antes del inicio de la sintomatología, y que podrían permitir, junto con otros criterios, el diagnóstico precoz de la enfermedad.

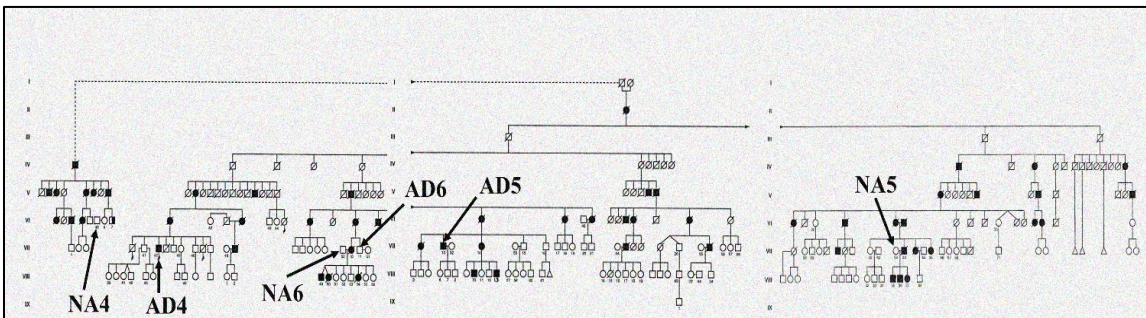
## 11. Perspectivas

Como perspectiva, se requiere investigar los mecanismos por los cuales las mutaciones de PS1 inducen las alteraciones observadas en los fibroblastos, incluidas otras vías de señalización como la regulación de la concentración intracelular de calcio, el metabolismo de la glucosa, y el estrés oxidante, identificadas en el análisis proteómico, así como la señalización mediada por GPCRs y otros tipos de receptores, elementos de la membrana plasmática y moléculas de unión a citoesqueleto, encontradas en el estudio de RNA-seq. Lo anterior permitiría una mejor comprensión de la patología de la EA y el descubrimiento de otros cambios en los tejidos periféricos de los pacientes con la EA, y que puedan ser marcadores para predecir la aparición y el desarrollo de la enfermedad.

## 12. Anexos



**Figura suplementaria 1. Árbol genealógico de la familia italiana de los individuos con EA familiar (PS1-M146L).** Los individuos de los que se generaron las líneas celulares de fibroblastos se indican junto con su condición: AD, Enfermedad de Alzheimer; NA, no afectado (imagen modificada de Fonci et al., 1985).



**Figura suplementaria 2. Árbol genealógico de la familia canadiense de los individuos con EA familiar (PS1-A246E).** Los individuos de los que se generaron las líneas celulares de fibroblastos se indican junto con su condición: AD, Enfermedad de Alzheimer; NA, no afectado (imagen modificada de Nee et al., 1983).

**Tabla suplementaria 1.** Perfil proteico representativo de fibroblastos afectados con la EA familiar (EA1 y EA2) y controles (NA2 y NA3) derivado del análisis de espectrometría de masas

N° accession	Protein	Present in control cells	Present in affected cells	MW (KDa)	pI-pH (experimental)	Gene
<b>ACTB_HUMAN</b>	Actin	X	X	40.47	5.7	ACTB
<b>ANXA2_HUMAN</b>	Annexin A2	X	X	38.55	7.7	ANXA2
<b>VIMEN_HUMAN</b>	Vimentin	X	X	53.61	4.8	VIM
<b>ANXA5_HUMAN</b>	Annexin A5	X	X	35.9	4.7	ANXA5
<b>LDHA_HUMAN</b>	L-lactate dehydrogenase A chain	X	X	36.66	8.4	LDHA
<b>UBE2C_HUMAN</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	X	X	147.24	8.1	UBE2C
<b>ANXA1_HUMAN</b>	Annexin A1	X	X	38.6	6.6	ANXA1
<b>LMNA_HUMAN</b>	Prelamin-A/C	X	X	74.09	6.6	LMNA
<b>G3P_HUMAN</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	X	X	31.52	7.4	GAPDH
<b>TBA1B_HUMAN</b>	Tubulin alpha-1B chain	X	X	46.53	4.6	TUBA1B
<b>TBB5_HUMAN</b>	Tubulin beta chain	X	X	46.53	4.6	TUBB
<b>H4_HUMAN</b>	Histone H4	X	X	36.3	11.8	H4C1
<b>PROF1_HUMAN</b>	Profilin-1	X	X	15.04	8.5	PFN1
<b>TPIS_HUMAN</b>	Triosephosphate isomerase	X	X	26.65	6.5	TPI1
<b>LEG1_HUMAN</b>	Galectin-1	X	X	14.7	5.1	LGALS1
<b>ENOA_HUMAN</b>	Alpha-enolase	X	X	47.12	7.2	ENO1
<b>NDKA_HUMAN</b>	Nucleoside diphosphate kinase	X	X	32.62	8.6	NME1

<b>SH3L3_HUMAN</b>	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	X	X	26.8	8.4	SH3BGRL3
<b>NB5R3_HUMAN</b>	NADH-cytochrome b5 reductase 3	X	X	33.21	7.4	CYB5R3
<b>RLA2_HUMAN</b>	60S acidic ribosomal protein P2	X	X	11.65	4.2	RPLP2
<b>PPIA_HUMAN</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	X	X	18	7.9	PPIA
<b>COF1_HUMAN</b>	Cofilin-1	X	X	22.71	8.5	CFL1
<b>TAGL_HUMAN</b>	Transgelin	X	X	20.87	9.2	TAGLN
<b>KPYM_HUMAN</b>	Pyruvate kinase PKM	X	X	57.9	7.7	PKM
<b>SERP_HUMAN</b>	Serpin H1	X	X	46.41	9	SERPINH1
<b>PDIA1_HUMAN</b>	Protein disulfide-isomerase	X	X	57.08	4.6	P4HB
<b>EF1A1_HUMAN</b>	Elongation factor 1-alpha	X	X	50.1	9.2	EEF1A1
<b>VAT1_HUMAN</b>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1	X	X	41.89	5.9	VAT1
<b>S10A4_HUMAN</b>	Protein S100-A4	X	X	11.72	5.7	S100A4
<b>GSTP1_HUMAN</b>	Glutathione S-transferase P	X	X	23.34	5.3	GSTP1
<b>ANXA1_HUMAN</b>	Annexin A1	X	X	36.05	5.5	ANXA1
<b>ATPA_HUMAN</b>	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	X	X	59.71	9.4	ATP5F1A
<b>CATD_HUMAN</b>	Cathepsin D	X	X	44.52	6.1	CTSD
<b>ANXA6_HUMAN</b>	Annexin A6	X	X	37.7	7	ANXA6
<b>CAP1_HUMAN</b>	Adenylyl cyclase-associated protein 1	X	X	51.58	8.3	CAP1
<b>NPM_HUMAN</b>	Nucleophosmin	X	X	52.55	4.4	NPM1
<b>ALDOA_HUMAN</b>	Fructose-bisphosphate aldolase A	X	X	17.78	8.8	ALDOA
<b>RCN3_HUMAN</b>	Reticulocalbin-3	X	X	37.4	4.5	RCN3
<b>AHNK_HUMAN</b>	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	X	X	180.53	5.7	AHNAK



<b>HNRPK_HUMAN</b>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	X	X	35.98	8.9	HNRNPK
<b>PDIA6_HUMAN</b>	Protein disulfide-isomerase A6	X	X	47.8	4.7	PDIA6
<b>1433Z_HUMAN</b>	14-3-3 protein zeta/delta/eta	X	X	27.72	4.5	YWHAZ
<b>CALU_HUMAN</b>	Calumenin	X	X	37.08	4.3	CALU
<b>ACTN1_HUMAN</b>	Alpha-actinin-1	X	X	101.87	5.1	ACTN1
<b>ATPB_HUMAN</b>	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	X	X	56.7	4.9	ATP5F1B
<b>PGK1_HUMAN</b>	Phosphoglycerate kinase 1	X	X	44.49	8.1	PGK1
<b>PRDX1_HUMAN</b>	Peroxiredoxin-1	X	X	18.49	6.4	PRDX1
<b>BASP1_HUMAN</b>	Brain acid soluble protein 1	X	X	22649	4.4	BASP1
<b>FINC_HUMAN</b>	Fibronectin	X	X	235.27	5.3	FN1
<b>H2A1A_HUMAN</b>	Histone H2A	X	X	27.1	10.3	H2AC1
<b>TPM2_HUMAN</b>	Tropomyosin beta chain	X	X	32.96	4.4	TPM2
<b>CALD1_HUMAN</b>	Caldesmon	X	X	64.21	6.7	CALD1
<b>PDIA3_HUMAN</b>	Protein disulfide-isomerase A3	X	X	56.7	5.9	PDIA3
<b>FLNA_HUMAN</b>	Filamin-A	X	X	153.5	5.3	FLNA
<b>RLA1_HUMAN</b>	Ribosomal protein, large, P1	X	X	11.5	4	RPLP1
<b>S10A6_HUMAN</b>	Protein S100-A6	X	X	10.17	5.1	S100A6
<b>CAVN1_HUMAN</b>	Caveolae-associated protein 1	X	X	43.44	5.3	CAVIN1
<b>HS90B_HUMAN</b>	Heat shock protein HSP 90-beta	X	X	82.11	4.7	HSP90AB1
<b>DPYL2_HUMAN</b>	Dihydropyrimidinase-related protein 2	X	X	58.12	5.7	DPYSL2
<b>GRP75_HUMAN</b>	Stress-70 protein, mitochondrial	X	X	73.63	5.7	HSPA9
<b>PGAM1_HUMAN</b>	Phosphoglycerate mutase 1	X	X	28.81	6.7	PGAM1
<b>HSPB1_HUMAN</b>	Heat shock protein beta-1	X	X	22.76	5.9	HSPB1

<b>CO1A1_HUMAN</b>	Collagen alpha-1(I) chain	X	X	138.82	5.4	COL1A1
<b>VINC_HUMAN</b>	Vinculin	X	X	123.72	5.3	VCL
<b>ML12A_HUMAN</b>	Myosin regulatory light chain 12A	X	X	19.75	4.5	MYL12A
<b>PLIN3_HUMAN</b>	Perilipin-3	X	X	45.77	5.1	PLIN3
<b>PRDX6_HUMAN</b>	Peroxiredoxin-6	X	X	25.01	6	PRDX6
<b>AMPN_HUMAN</b>	Aminopeptidase N	X	X	109.4	5.1	ANPEP
<b>CKAP4_HUMAN</b>	Cytoskeleton-associated protein 4	X	X	65.98	5.5	CKAP4
<b>CO1A2_HUMAN</b>	Collagen alpha-2(I) chain	X	X	126.49	9.2	COL1A2
<b>RHOC_HUMAN</b>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	X	X	21.99	6.2	RHOC
<b>CNN2_HUMAN</b>	Calponin-2	X	X	35.9	7	CNN2
<b>CO6A1_HUMAN</b>	Collagen alpha-1(VI) chain	X	X	138.72	5.45	COL6A1
<b>CLIC1_HUMAN</b>	Chloride intracellular channel protein 1	X	X	26.99	4.89	CLIC1
<b>CALR_HUMAN</b>	Calreticulin	X	X	48.11	4	CALR
<b>ENPL_HUMAN</b>	Endoplasmin	X	X	92.41	4.6	HSP90B1
<b>GSTO1_HUMAN</b>	Glutathione S-transferase omega-1	X		26.7	5.5	GSTO1
<b>RCN1_HUMAN</b>	Reticulocalbin-1	X		37.47	4.5	RCN1
<b>RAP1A_HUMAN</b>	Ras-related protein Rap-1A	X		20.8	5.5	RAP1A
<b>CD99_HUMAN</b>	CD99 antigen	X		17.11	4.2	CD99
<b>BAF_HUMAN</b>	Barrier to autointegration factor 1	X		10.05	5.7	BANF1
<b>MRP_HUMAN</b>	MARCKS-related protein	X		14.85	4.6	MARCKSL1
<b>5NTD_HUMAN</b>	5'-nucleotidase	X		63.29	6.6	NT5E
<b>AXDN1_HUMAN</b>	Axonemal dynein light chain domain-containing protein 1	X		101.77	5.6	AXDND1

<b>MVP_HUMAN</b>	Major vault protein	X	91.9	5.1	MVP	
<b>LACRT_HUMAN</b>	Extracellular glycoprotein lacritin	X	14.23	5.3	LACRT	
<b>LCN1_HUMAN</b>	Lipocalin-1	X	19.23	5.2	LCN1	
<b>CATB_HUMAN</b>	Cathepsin B	X	37.79	5.9	CTSB	
<b>PIP_HUMAN</b>	Prolactin-inducible protein	X	16.56	8.1	PIP	
<b>ARL4C_HUMAN</b>	ADP-ribosylation factor-like protein 4C	X	20.79	6.2	ARL4C	
<b>HS90A_HUMAN</b>	Heat shock protein HSP 90-alpha	X	83.34	4.9	HSP90AA1	
<b>SODM_HUMAN</b>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	X	24.72	8.4	SOD2	
<b>UBE2N_HUMAN</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	X	17.12	6.1	UBE2N	
<b>PSME1_HUMAN</b>	Proteasome activator complex subunit 1	X	28.5	5.7	PSME1	
<b>PTBP1_HUMAN</b>	Polypyrimidine tract-binding protein 2	X	56.85	9.5	PTBP2	
<b>PIN4_HUMAN</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	X	17.99	7.8	PIN4	
<b>GELS_HUMAN</b>	Gelsolin	X	81.43	5.5	GSN	
<b>RSSA_HUMAN</b>	40S ribosomal protein SA	X	32.7	4.8	RPSA	
<b>CO6A3_HUMAN</b>	Collagen alpha-3(VI) chain	X	113.18	5.3	COL6A3	
<b>EHD2_HUMAN</b>	EH domain-containing protein 2	X	38.65	7.7	EHD2	
<b>P4HA1_HUMAN</b>	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	X	58.92	5.6	P4HA1	
<b>H2B1N_HUMAN</b>	Histone H2B type 1-N	X	18.68	11.1	H2BC15	
<b>GLPK_HUMAN</b>	Glycerol kinase	X	56.94	5.2	GK	
<b>IF5A1_HUMAN</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1		X	16.82	4.8	EIF5A
<b>RAP1B_HUMAN</b>	Ras-related protein Rap-1B		X	20.81	5.4	RAP1B
<b>H2B1C_HUMAN</b>	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I		X	23.13	10.6	H2BC4

<b>MYL6_HUMAN</b>	Myosin light polypeptide 6	X	26.68	4.8	MYL6
<b>MYH9_HUMAN</b>	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	X	226.39	5.3	MYH9
<b>HSP7C_HUMAN</b>	Heat shock cognate 71 kDa protein	X	53.48	5.4	HSPA8
<b>CALM2_HUMAN</b>	CALM2 protein	X	16.95	3.8	CALM2
<b>ARF4_HUMAN</b>	ADP-ribosylation factor 4	X	20.49	7	ARF4
<b>ARPC4_HUMAN</b>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	X	21.57	8.8	ARPC4
<b>RTN4_HUMAN</b>	Reticulon-4	X	40.29	4.4	RTN4
<b>SAR1A_HUMAN</b>	SARA1 protein	X	65.98	5.5	SARA1
<b>CH10_HUMAN</b>	Heat shock 10kDa protein 1 (Chaperonin 10)	X	7.5	7	HSPE1
<b>MFGM_HUMAN</b>	Lactadherin	X	29.14	7.7	MFGE8
<b>SERA_HUMAN</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	X	52.97	6.7	PHGDH
<b>PLST_HUMAN</b>	Plastin-3	X	69.29	5.5	PLS3
<b>MYL9_HUMAN</b>	Myosin regulatory light polypeptide 9	X	19.79	4.4	MYL9
<b>EF1B_HUMAN</b>	Elongation factor 1-beta	X	24.81	4.4	EEF1B2
<b>UGDH_HUMAN</b>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	X	54.98	6.7	UGDH
<b>CH60_HUMAN</b>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	X	56.63	4.9	HSPD1
<b>EF2_HUMAN</b>	Elongation factor 2	X	95.05	6.2	EEF2
<b>SYWC_HUMAN</b>	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	X	53.44	5.4	WARS
<b>ASAP2_HUMAN</b>	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	X	108.87	6.6	ASAP2
<b>IMB1_HUMAN</b>	Importin subunit beta-1	X	109.28	4.5	KPNB1
<b>H2AJ_HUMAN</b>	Histone H2A.J	X	14.01	11.3	H2AJ
<b>TERA_HUMAN</b>	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	X	89.26	5.0	VCP

<b>IF4H_HUMAN</b>	Eukaryotic translation initiation factor 4H	X	10.19	11.4	EIF4H
<b>NFM_HUMAN</b>	Neurofilament medium polypeptide	X	95.17	4.6	NEFM
<b>BIP_HUMAN</b>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	X	72.59	5.8	HSPA5
<b>LDHB_HUMA</b>	L-lactate dehydrogenase B chain	X	36.6	5.1	LDHB



# Patient-Derived Fibroblasts With Presenilin-1 Mutations, That Model Aspects of Alzheimer's Disease Pathology, Constitute a Potential Object for Early Diagnosis

Gustavo Lopez-Toledo<sup>1,2</sup>, Maria-del-Carmen Silva-Lucero<sup>1</sup>, Jorge Herrera-Diaz<sup>3</sup>, David-Erasmo Garcia<sup>4</sup>, José-Antonio Arias-Montaño<sup>2</sup> and Maria-del-Carmen Cardenas-Aguayo<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Chunling Dai,  
Institute for Basic Research  
in Developmental Disabilities (IBRD),  
United States

### Reviewed by:

Budheswar Dehury,  
Regional Medical Research Centre  
(ICMR), India  
Jianhua Shi,  
Harvard Medical School,  
United States

### \*Correspondence:

Maria-del-Carmen  
Cardenas-Aguayo  
mcardenasaguayo@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Alzheimer's Disease and Related  
Dementias,  
a section of the journal  
Frontiers in Aging Neuroscience

Received: 16 April 2022

Accepted: 13 June 2022

Published: 01 July 2022

### Citation:

Lopez-Toledo G,  
Silva-Lucero M-del-C, Herrera-Diaz J,  
Garcia D-E, Arias-Montaño J-A and  
Cardenas-Aguayo M-del-C (2022)  
Patient-Derived Fibroblasts With  
Presenilin-1 Mutations, That Model  
Aspects of Alzheimer's Disease  
Pathology, Constitute a Potential  
Object for Early Diagnosis.  
Front. Aging Neurosci. 14:921573.  
doi: 10.3389/fnagi.2022.921573

Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disorder that can occur in middle or old age, is characterized by memory loss, a continuous decline in thinking, behavioral and social skills that affect the ability of an individual to function independently. It is divided into sporadic and familial subtypes. Early-onset familial AD (FAD) is linked to mutations in genes coding for the amyloid- $\beta$  protein precursor ( $A\beta$ PP), presenilin 1 (PS1), and presenilin 2 (PS2), which lead to alterations in  $A\beta$ PP processing, generation of the Amyloid- $\beta$  peptide and hyperphosphorylation of tau protein. Identification of early biomarkers for AD diagnosis represents a challenge, and it has been suggested that molecular changes in neurodegenerative pathways identified in the brain of AD patients can be detected in peripheral non-neural cells derived from familial or sporadic AD patients. In the present study, we determined the protein expression, the proteomic and *in silico* characterization of skin fibroblasts from FAD patients with PS1 mutations (M146L or A246E) or from healthy individuals. Our results shown that fibroblasts from AD patients had increased expression of the autophagy markers LC3II, LAMP2 and Cathepsin D, a significant increase in total GSK3, phosphorylated ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) and phosphorylated tau (Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>396</sup>, and Ser<sup>404</sup>), but no difference in the phosphorylation of Akt (Ser<sup>473</sup>) or the  $\alpha$  (Ser<sup>21</sup>) and  $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) GSK3 isoforms, highlighting the relevant role of abnormal protein post-translational modifications in age-related neurodegenerative diseases, such as AD. Both 2-DE gels and mass spectrometry showed significant differences in the expression of the signaling pathways associated with protein folding and the autophagic pathway mediated by chaperones with the expression of HSPA5, HSPE1, HSPD1, HSP90AA1, and HSPE1 and reticular stress in the FAD samples. Furthermore, expression of the heat shock proteins HSP90 and HSP70 was significantly higher in the cells from AD patients as

## 13. Bibliografía

1. Aalinkeel, R., Mahajan, S. D. (2016). Neuroprotective role of galectin-1 in central nervous system pathophysiology. *Neural Regen Res*, 11(6), 896-897. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.184455>
2. Abramov, A. Y., Canevari, L., y Duchen, M. R. (2004). Calcium signals induced by amyloid  $\beta$  peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1742(1), 81-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.006>
3. Adachi, H., Katsuno, M., Waza, M., Minamiyama, M., Tanaka, F., Sobue, G. (2009). Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: pathogenic roles and therapeutic implications. *Int J Hyperthermia*, 25(8), 647-654. <https://doi.org/10.3109/02656730903315823>
4. Allahbakhshian-Farsani, M., Abdian, N., Ghasemi-Dehkordi, P., Sadeghiani, M., Saffari-Chaleshtori, J., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Khosravi-Farsani, S. (2014). Cytogenetic analysis of human dermal fibroblasts (HDFs) in early and late passages using both karyotyping and comet assay techniques. *Cytotechnology*, 66(5), 815-822. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9630-y>
5. Allgöwer, C., Kretz, A. L., von Karstedt, S., Wittau, M., Henne-Bruns, D., Lemke, J. (2020). Friend or Foe: S100 Proteins in Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/cancers12082037>
6. Alonso, A. D., Cohen, L. S., Corbo, C., Morozova, V., Elldrissi, A., Phillips, G., Kleiman, F. E. (2018). Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. *Front Cell Neurosci*, 12, 338. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00338>
7. Ambrosi, G., Ghezzi, C., Sepe, S., Milanese, C., Payan-Gomez, C., Bombardieri, C. R., Armentero, M. T., Zangaglia, R., Pacchetti, C., Mastroberardino, P. G., Blandini, F. (2014). Bioenergetic and proteolytic defects in fibroblasts from patients with sporadic Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1842(9), 1385-1394. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.008>
8. Antonell, A., Lladó, A., Altirriba, J., Botta-Orfila, T., Balasa, M., Fernández, M., Ferrer, I., Sánchez-Valle, R., Molinuevo, J. L. (2013). A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and monogenic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 34(7), 1772-1778. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.12.026>
9. Arber, C., Toombs, J., Lovejoy, C., Ryan, N. S., Paterson, R. W., Willumsen, N., Gkanatsiou, E., Portelius, E., Blennow, K., Heslegrave, A., Schott, J. M., Hardy, J., Lashley, T., Fox, N. C., Zetterberg, H., Wray, S. (2020). Familial Alzheimer's disease patient-derived neurons reveal distinct mutation-specific effects on amyloid beta. *Mol Psychiatry*, 25(11), 2919-2931. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0410-8>

10. Armstrong, A., Mattsson, N., Appelqvist, H., Janefjord, C., Sandin, L., Agholme, L., Olsson, B., Svensson, S., Blennow, K., Zetterberg, H., Kågedal, K. (2014). Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 16(1), 150-160. <https://doi.org/10.1007/s12017-013-8269-3>
11. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182-196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
12. Auburger, G., Klinkenberg, M., Drost, J., Marcus, K., Morales-Gordo, B., Kunz, W. S., Brandt, U., Broccoli, V., Reichmann, H., Gispert, S., Jendrach, M. (2012). Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 46(1), 20-27. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8245-1>
13. Auffret, A., Gautheron, V., Repici, M., Kraftsik, R., Mount, H. T., Mariani, J., Rovira, C. (2009). Age-dependent impairment of spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of a presenilin 1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29(32), 10144-10152. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1856-09.2009>
14. Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M., Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 103(1), 26-35. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>
15. Avrahami, L., Eldar-Finkelman, H. (2013). GSK-3 and lysosomes meet in Alzheimer's disease. *Commun Integr Biol*, 6(5), e25179. <https://doi.org/10.4161/cib.25179>
16. Bader, J. M., Geyer, P. E., Muller, J. B., Strauss, M. T., Koch, M., Leyboldt, F., Koertvelyessy, P., Bittner, D., Schipke, C. G., Incesoy, E. I., Peters, O., Deigendesch, N., Simons, M., Jensen, M. K., Zetterberg, H., Mann, M. (2020). Proteome profiling in cerebrospinal fluid reveals novel biomarkers of Alzheimer's disease. *Mol Syst Biol*, 16(6), e9356. <https://doi.org/10.15252/msb.20199356>
17. Bahmad, H., Hadadeh, O., Chamaa, F., Cheaito, K., Darwish, B., Makkawi, A. K., Abou-Kheir, W. (2017). Modeling Human Neurological and Neurodegenerative Diseases: From Induced Pluripotent Stem Cells to Neuronal Differentiation and Its Applications in Neurotrauma. *Front Mol Neurosci*, 10, 50. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00050>
18. Bai, B., Vanderwall, D., Li, Y., Wang, X., Poudel, S., Wang, H., Dey, K. K., Chen, P.-C., Yang, K., Peng, J. (2021). Proteomic landscape of Alzheimer's Disease: novel insights into pathogenesis and biomarker discovery. *Mol Neurodegener*, 16(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00474-z>
19. Ballabio, A., Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 101-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4>



20. Bandyopadhyay, U., Cuervo, A. M. (2008). Entering the lysosome through a transient gate by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 4(8), 1101-1103. <https://doi.org/10.4161/auto.7150>
21. Bang, H., Kim, J. E., Lee, H. S., Park, S. M., Park, D.-J., Lee, E. J. (2022). Integrated bioinformatic analysis of gene expression profiling data to identify combinatorial biomarkers in inflammatory skin disease. *Scientific Reports*, 12(1), 5889. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09840-3>
22. Baumgartner, C., Osl, M., Netzer, M., Baumgartner, D. (2011). Bioinformatic-driven search for metabolic biomarkers in disease. *J Clin Bioinforma*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2043-9113-1-2>
23. Beh, S. T., Frisch, C., Brafman, D. A., Churko, J., Walker, J. E., Serrano, G. E., Sue, L. I., Reiman, E. M., Beach, T. G., Lue, L. F. (2020). Human Autopsy-Derived Scalp Fibroblast Biobanking for Age-Related Neurodegenerative Disease Research. *Cells*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/cells9112383>
24. Bianchi, F. T., Camera, P., Ala, U., Imperiale, D., Migheli, A., Boda, E., Tempia, F., Berto, G., Bosio, Y., Oddo, S., LaFerla, F. M., Taraglio, S., Dotti, C. G., Di Cunto, F. (2011). The collagen chaperone HSP47 is a new interactor of APP that affects the levels of extracellular beta-amyloid peptides. *PLoS One*, 6(7), e22370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022370>
25. Blair, L. J., Sabbagh, J. J., Dickey, C. A. (2014). Targeting Hsp90 and its co-chaperones to treat Alzheimer's disease. *Expert opinion on therapeutic targets*, 18(10), 1219-1232. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.943185>
26. Blalock, E. M., Geddes, J. W., Chen, K. C., Porter, N. M., Markesbery, W. R., Landfield, P. W. (2004). Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7), 2173-2178. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308512100>
27. Blanchard, H., Bum-Erdene, K., Bohari, M. H., Yu, X. (2016). Galectin-1 inhibitors and their potential therapeutic applications: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 26(5), 537-554. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1163338>
28. Bodovitz, S., Klein, W. L. (1996). Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 271(8), 4436-4440. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4436>
29. Boraldi, F., Bini, L., Liberatori, S., Armini, A., Pallini, V., Tiozzo, R., Ronchetti, I. P., Quaglino, D. (2003). Normal human dermal fibroblasts: proteomic analysis of cell layer and culture medium. *Electrophoresis*, 24(7-8), 1292-1310. <https://doi.org/10.1002/elps.200390166>
30. Borchelt, D. R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., Sisodia, S. S. (1997). Accelerated Amyloid Deposition in the Brains of Transgenic Mice Coexpressing Mutant Presenilin 1 and Amyloid Precursor Proteins.

- Neuron*, 19(4), 939-945. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80974-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80974-5)
31. Bresnick, A. R., Weber, D. J., Zimmer, D. B. (2015). S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(2), 96-109. <https://doi.org/10.1038/nrc3893>
  32. Bubber, P., Ke, Z. J., Gibson, G. E. (2004). Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int*, 45(7), 1021-1028. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.05.007>
  33. Bustos, V., Pulina, M. V., Bispo, A., Lam, A., Flajolet, M., Gorelick, F. S., Greengard, P. (2017). Phosphorylated Presenilin 1 decreases  $\beta$ -amyloid by facilitating autophagosome-lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(27), 7148-7153. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705240114>
  34. Butterfield, D. A., Boyd-Kimball, D. (2019). Redox proteomics and amyloid  $\beta$ -peptide: insights into Alzheimer disease. *J Neurochem*, 151(4), 459-487. <https://doi.org/10.1111/jnc.14589>
  35. Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C., Castegna, A. (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends in molecular medicine*, 7(12), 548-554. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(01\)02173-6](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(01)02173-6)
  36. Butterfield, D. A., Gnjec, A., Poon, H. F., Castegna, A., Pierce, W. M., Klein, J. B., Martins, R. N. (2006). Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer's disease: an initial assessment. *J Alzheimers Dis*, 10(4), 391-397. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-10407>
  37. Butterfield, D. A., Lauderback, C. M. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 32(11), 1050-1060. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00794-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00794-3)
  38. Butzlaff, M., Hannan, S. B., Karsten, P., Lenz, S., Ng, J., Vossfeldt, H., Prussing, K., Pflanz, R., Schulz, J. B., Rasse, T., Voigt, A. (2015). Impaired retrograde transport by the Dynein/Dynactin complex contributes to Tau-induced toxicity. *Hum Mol Genet*, 24(13), 3623-3637. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv107>
  39. Cacace, R., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*, 12(6), 733-748. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012>
  40. Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., Colasante, G., Bartolomeo, R., Massimino, L., Ferroni, S., Settembre, C., Benfenati, F., Broccoli, V. (2015). Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem Cell Reports*, 4(1), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.002>
  41. Calabrese, V., Sultana, R., Scapagnini, G., Guagliano, E., Sapienza, M., Bella, R., Kanski, J., Pennisi, G., Mancuso, C., Stella, A. M., Butterfield, D. A. (2006). Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol

- homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal*, 8(11-12), 1975-1986. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1975>
42. Calabrò, M., Rinaldi, C., Santoro, G., Crisafulli, C. (2021). The biological pathways of Alzheimer disease: a review. *AIMS Neurosci*, 8(1), 86-132. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2021005>
43. Campanella, C., Pace, A., Caruso Bavisotto, C., Marzullo, P., Marino Gammazza, A., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A. (2018). Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2603. <https://doi.org/10.3390/ijms19092603>
44. Campanella, C., Pace, A., Caruso Bavisotto, C., Marzullo, P., Marino Gammazza, A., Buscemi, S., Palumbo Piccionello, A. (2018). Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting. *Int J Mol Sci*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092603>
45. Canchi, S., Raao, B., Masliah, D., Rosenthal, S. B., Sasik, R., Fisch, K. M., De Jager, P. L., Bennett, D. A., Rissman, R. A. (2019). Integrating Gene and Protein Expression Reveals Perturbed Functional Networks in Alzheimer's Disease. *Cell Rep*, 28(4), 1103-1116.e1104. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.073>
46. Carrillo-Mora, P., Luna, R., Colín-Barenque, L. (2014). Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 795375-795375. <https://doi.org/10.1155/2014/795375>
47. Cascella, R., Cecchi, C. (2021). Calcium Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4914. <https://doi.org/10.3390/ijms22094914>
48. Castro-Alvarez, J. F., Uribe-Arias, S. A., Mejia-Raigosa, D., Cardona-Gomez, G. P. (2014). Cyclin-dependent kinase 5, a node protein in diminished tauopathy: a systems biology approach. *Front Aging Neurosci*, 6, 232. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00232>
49. Cavieres, V. A., Gonzalez, A., Munoz, V. C., Yefi, C. P., Bustamante, H. A., Barraza, R. R., Tapia-Rojas, C., Otth, C., Barrera, M. J., Gonzalez, C., Mardones, G. A., Inestrosa, N. C., Burgos, P. V. (2015). Tetrahydroperforin Inhibits the Proteolytic Processing of Amyloid Precursor Protein and Enhances Its Degradation by Atg5-Dependent Autophagy. *PLoS One*, 10(8), e0136313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136313>
50. Chan, S. L., Mayne, M., Holden, C. P., Geiger, J. D., Mattson, M. P. (2000). Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem*, 275(24), 18195-18200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000040200>
51. Chang, H. Y., Chi, J. T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., Brown, P. O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 12877-12882. <https://doi.org/10.1073/pnas.162488599>
52. Chang, Y.-S., Lee, L.-C., Sun, F.-C., Chao, C.-C., Fu, H.-W., Lai, Y.-K. (2006). Involvement of calcium in the differential induction of heat shock

- protein 70 by heat shock protein 90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, in human non-small cell lung cancer H460 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(1), 156-165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcb.20623>
53. Chen, C., Hou, J., Tanner, J. J., Cheng, J. (2020). Bioinformatics Methods for Mass Spectrometry-Based Proteomics Data Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2873. <https://doi.org/10.3390/ijms21082873>
  54. Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*, 38(9), 1205-1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
  55. Chui, D. H., Tanahashi, H., Ozawa, K., Ikeda, S., Checler, F., Ueda, O., Suzuki, H., Araki, W., Inoue, H., Shirotani, K., Takahashi, K., Gallyas, F., Tabira, T. (1999). Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med*, 5(5), 560-564. <https://doi.org/10.1038/8438>
  56. Collin, L., Bohrmann, B., Gopfert, U., Oroszlan-Szovik, K., Ozmen, L., Gruninger, F. (2014). Neuronal uptake of tau/pS422 antibody and reduced progression of tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain*, 137(Pt 10), 2834-2846. <https://doi.org/10.1093/brain/awu213>
  57. Conejero-Goldberg, C., Hyde, T. M., Chen, S., Dreses-Werringloer, U., Herman, M. M., Kleinman, J. E., Davies, P., Goldberg, T. E. (2011). Molecular signatures in post-mortem brain tissue of younger individuals at high risk for Alzheimer's disease as based on APOE genotype. *Mol Psychiatry*, 16(8), 836-847. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.57>
  58. Costa-Mattoli, M., Sossin, W. S., Klann, E., Sonenberg, N. (2009). Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*, 61(1), 10-26. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.055>
  59. Crews, L., Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 19(R1), R12-20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>
  60. Cristóvão, J. S., Gomes, C. M. (2019). S100 Proteins in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 13, 463. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00463>
  61. Cuervo, A. M., Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*, 24(1), 92-104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>
  62. da Rosa, M. M., de Aguiar Ferreira, M., de Oliveira Lima, C. A., Santos Mendonça, A. C., Silva, Y. M., Sharjeel, M., de Melo Rego, M. J. B., Pereira, M. C., da Rocha Pitta, M. G. (2021). Alzheimer's disease: Is there a role for galectins? *Eur J Pharmacol*, 909, 174437. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174437>
  63. De Strooper, B. (2007). Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in

- Alzheimer disease. *EMBO Rep*, 8(2), 141-146. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400897>
64. De Strooper, B., Vassar, R., Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 6(2), 99-107. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.218>
  65. Dehvari, N., Isacson, O., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., Cowburn, R. F. (2008). Presenilin regulates extracellular regulated kinase (Erk) activity by a protein kinase C alpha dependent mechanism. *Neurosci Lett*, 436(1), 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.02.063>
  66. Delbarba, A., Abate, G., Prandelli, C., Marziano, M., Buizza, L., Arce Varas, N., Novelli, A., Cuetos, F., Martinez, C., Lanni, C., Memo, M., Uberti, D. (2016). Mitochondrial Alterations in Peripheral Mononuclear Blood Cells from Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Patients. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 5923938. <https://doi.org/10.1155/2016/5923938>
  67. Demuro, A., Parker, I. (2013). Cytotoxicity of intracellular  $\alpha\beta 42$  amyloid oligomers involves  $\text{Ca}^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum by stimulated production of inositol trisphosphate. *J Neurosci*, 33(9), 3824-3833. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4367-12.2013>
  68. Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E., Girardin, S. E., Wilson, M. I., Tooze, S. A. (2014). WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell*, 55(2), 238-252. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.021>
  69. Dorsam, R. T., Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(2), 79-94. <https://doi.org/10.1038/nrc2069>
  70. Dou, F., Netzer, W. J., Takashima, A., Xu, H. (2003). Heat shock proteins reduce aggregation and facilitate degradation of tau protein. *International Congress Series*, 1252, 383-393. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(03\)00077-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0531-5131(03)00077-3)
  71. Dries, D. R., Yu, G. (2008). Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 5(2), 132-146. <https://doi.org/10.2174/156720508783954695>
  72. Drummond, E., Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133(2), 155-175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
  73. Duarte Escalante, E., Frías De León, M. G., Martínez García, L. G., Herrera, J., Acosta Altamirano, G., Cabello, C., Palma, G., Reyes Montes, M. D. R. (2018). Selection of Specific Peptides for *Coccidioides* spp. Obtained from Antigenic Fractions through SDS-PAGE and Western Blot Methods by the Recognition of Sera from Patients with *Coccidioidomycosis*. *Molecules*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123145>
  74. Dugger, B. N., Whiteside, C. M., Maarouf, C. L., Walker, D. G., Beach, T. G., Sue, L. I., Garcia, A., Dunckley, T., Meechoovet, B., Reiman, E. M., Roher, A. E. (2016). The Presence of Select Tau Species in Human

- Peripheral Tissues and Their Relation to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 54(3), 1249. <https://doi.org/10.3233/jad-169007>
75. Dunckley, T., Beach, T. G., Ramsey, K. E., Grover, A., Mastroeni, D., Walker, D. G., LaFleur, B. J., Coon, K. D., Brown, K. M., Caselli, R., Kukull, W., Higdon, R., McKeel, D., Morris, J. C., Hulette, C., Schmechel, D., Reiman, E. M., Rogers, J., Stephan, D. A. (2006). Gene expression correlates of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27(10), 1359-1371. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.013>
  76. Elder, G. A., Gama Sosa, M. A., De Gasperi, R., Dickstein, D. L., Hof, P. R. (2010). Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct*, 214(2-3), 127-143. <https://doi.org/10.1007/s00429-009-0227-3>
  77. Eskelinen, E. L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med*, 27(5-6), 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.005>
  78. Filipek, A., Leśniak, W. (2020). S100A6 and Its Brain Ligands in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/ijms21113979>
  79. François, M., Leifert, W., Martins, R., Thomas, P., Fenech, M. (2014). Biomarkers of Alzheimer's disease risk in peripheral tissues; focus on buccal cells. *Curr Alzheimer Res*, 11(6), 519-531. <https://doi.org/10.2174/1567205011666140618103827>
  80. Frank, P. G., Cheung, M. W.-C., Pavlides, S., Llaverrias, G., Park, D. S., Lisanti, M. P. (2006). Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(2), H677-H686. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01092.2005>
  81. Gasparini, L., Racchi, M., Binetti, G., Trabucchi, M., Solerte, S. B., Alkon, D., Etcheberrigaray, R., Gibson, G., Blass, J., Paoletti, R., Govoni, S. (1998). Peripheral markers in testing pathophysiological hypotheses and diagnosing Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 12(1), 17-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fsb2fasebj.12.1.17>
  82. Gauthier-Kemper, A., Suárez Alonso, M., Sündermann, F., Niewidok, B., Fernandez, M.-P., Bakota, L., Heinisch, J. J., Brandt, R. (2018). Annexins A2 and A6 interact with the extreme N terminus of tau and thereby contribute to tau's axonal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 293(21), 8065-8076. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000490>
  83. Gerke, V., Moss, S. E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, 82(2), 331-371. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001>
  84. Gibson, G. E. (2002). Interactions of oxidative stress with cellular calcium dynamics and glucose metabolism in Alzheimer's disease<sup>1</sup>, 2  
<sup>1</sup>Guest Editors: Mark A. Smith and George Perry  
<sup>2</sup>This article is a part of a series of reviews on "Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease." The full list of papers may be found on

- the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1061-1070. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00802-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00802-X)
85. Gibson, G. E., Huang, H. M. (2002). Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci*, 7, d1007-1015. <https://doi.org/10.2741/a827>
  86. GIBSON, G. E., PARK, L. C. H., ZHANG, H., SORBI, S., CALINGASAN, N. Y. (1999). Oxidative Stress and a Key Metabolic Enzyme in Alzheimer Brains, Cultured Cells, and an Animal Model of Chronic Oxidative Deficits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 79-94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07819.x>
  87. Gibson, G. E., Zhang, H., Sheu, K. F. R., Park, L. C. H. (2000). Differential alterations in antioxidant capacity in cells from Alzheimer patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1502(3), 319-329. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00057-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00057-0)
  88. Giese, K. P. (2009). GSK-3: a key player in neurodegeneration and memory. *IUBMB Life*, 61(5), 516-521. <https://doi.org/10.1002/iub.187>
  89. Gómez-Isla, T., Growdon, W. B., McNamara, M. J., Nochlin, D., Bird, T. D., Arango, J. C., Lopera, F., Kosik, K. S., Lantos, P. L., Cairns, N. J., Hyman, B. T. (1999). The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors. *Brain*, 122 ( Pt 9), 1709-1719. <https://doi.org/10.1093/brain/122.9.1709>
  90. Gómez-Isla, T., Wasco, W., Pettingell, W. P., Gurubhagavatula, S., Schmidt, S. D., Jondro, P. D., McNamara, M., Rodes, L. A., DiBlasi, T., Growdon, W. B., Seubert, P., Schenk, D., Growdon, J. H., Hyman, B. T., Tanzi, R. E. (1997). A novel presenilin-1 mutation: increased beta-amyloid and neurofibrillary changes. *Ann Neurol*, 41(6), 809-813. <https://doi.org/10.1002/ana.410410618>
  91. Gomez-Nicola, D., Boche, D. (2015). Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 7(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0126-1>
  92. Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M. T., Avila, J. (2008). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci*, 37(4), 673-681. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.12.010>
  93. Gomez-Sintes, R., Hernandez, F., Lucas, J. J., Avila, J. (2011). GSK-3 Mouse Models to Study Neuronal Apoptosis and Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci*, 4, 45. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00045>
  94. Gong, C. X., Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem*, 15(23), 2321-2328. <https://doi.org/10.2174/092986708785909111>

95. Görlach, A., Klappa, P., Kietzmann, T. (2006). The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*, 8(9-10), 1391-1418. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1391>
96. Grimes, C. A., Jope, R. S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Progress in Neurobiology*, 65(4), 391-426. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00011-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00011-9)
97. Guerreiro, R., Hardy, J. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 11(4), 732-737. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0295-9>
98. Guldbrandsen, A., Vethe, H., Farag, Y., Oveland, E., Garberg, H., Berle, M., Myhr, K.-M., Opsahl, J. A., Barsnes, H., Berven, F. S. (2014). In-depth Characterization of the Cerebrospinal Fluid (CSF) Proteome Displayed Through the CSF Proteome Resource (CSF-PR)\*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(11), 3152-3163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/mcp.M114.038554>
99. Guo, Q., Furukawa, K., Sopher, B. L., Pham, D. G., Xie, J., Robinson, N., Martin, G. M., Mattson, M. P. (1996). Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport*, 8(1), 379-383. <https://doi.org/10.1097/00001756-199612200-00074>
100. Hajduch, M., Ganapathy, A., Stein, J. W., Thelen, J. J. (2005). A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiol*, 137(4), 1397-1419. <https://doi.org/10.1104/pp.104.056614>
101. Hardy, J. A., Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
102. Hartigan, J. A., Johnson, G. V. (1999). Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in Tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -dependent pathway. *J Biol Chem*, 274(30), 21395-21401. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21395>
103. Haslbeck, M., Buchner, J. (2002). Chaperone function of sHsps. *Prog Mol Subcell Biol*, 28, 37-59. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_3)
104. Head, B. P., Patel, H. H., Tsutsumi, Y. M., Hu, Y., Mejia, T., Mora, R. C., Insel, P. A., Roth, D. M., Drummond, J. C., Patel, P. M. (2008). Caveolin-1 expression is essential for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and protection of primary neurons from ischemic cell death. *Faseb j*, 22(3), 828-840. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9299com>
105. Head, B. P., Peart, J. N., Panneerselvam, M., Yokoyama, T., Pearn, M. L., Niesman, I. R., Bonds, J. A., Schilling, J. M., Miyanohara, A., Headrick, J., Ali, S. S., Roth, D. M., Patel, P. M., Patel, H. H. (2010).



- Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PLoS One*, 5(12), e15697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015697>
106. Hernandez-Zimbron, L. F., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D. H., Manoutcharian, K., Gevorkian, G. (2012). Amyloid- $\beta$  peptide binds to cytochrome C oxidase subunit 1. *PLoS One*, 7(8), e42344-e42344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042344>
  107. Hernández, F., Nido, J. D., Avila, J., Villanueva, N. (2009). GSK3 inhibitors and disease. *Mini Rev Med Chem*, 9(9), 1024-1029. <https://doi.org/10.2174/138955709788922647>
  108. Herrera-Díaz, J., Jelezova, M. K., Cruz-García, F., Dinkova, T. D. (2018). Protein Disulfide Isomerase (PDI1-1) differential expression and modification in Mexican malting barley cultivars. *PLoS One*, 13(11), e0206470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206470>
  109. Heywood, W. E., Galimberti, D., Bliss, E., Sirka, E., Paterson, R. W., Magdalinou, N. K., Carecchio, M., Reid, E., Heslegrave, A., Fenoglio, C., Scarpini, E., Schott, J. M., Fox, N. C., Hardy, J., Bhatia, K., Heales, S., Sebire, N. J., Zetterberg, H., Mills, K. (2015). Identification of novel CSF biomarkers for neurodegeneration and their validation by a high-throughput multiplexed targeted proteomic assay. *Mol Neurodegener*, 10, 64-64. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0059-y>
  110. Ho, A., Shen, J. (2011). Presenilins in synaptic function and disease. *Trends in molecular medicine*, 17(11), 617-624. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.06.002>
  111. Hoffman, K. B., Bi, X., Pham, J. T., Lynch, G. (1998).  $\beta$ -Amyloid increases cathepsin D levels in hippocampus. *Neuroscience Letters*, 250(2), 75-78. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00364-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00364-4)
  112. Hoffmann, J., Twisselmann, C., Kummer, M. P., Romagnoli, P., Herzog, V. (2000). A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *Eur J Cell Biol*, 79(12), 905-914. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00117>
  113. Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 104(6), 1433-1439. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x>
  114. Hopperton, K. E., Mohammad, D., Trépanier, M. O., Giuliano, V., Bazinet, R. P. (2018). Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Mol Psychiatry*, 23(2), 177-198. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>
  115. Hung, C. O. Y., Livesey, F. J. (2018). Altered  $\gamma$ -Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease. *Cell Rep*, 25(13), 3647-3660.e3642. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.095>
  116. Ikezu, T., Trapp, B. D., Song, K. S., Schlegel, A., Lisanti, M. P., Okamoto, T. (1998). Caveolae, Plasma Membrane Microdomains for  $\alpha$ -Secretase-mediated Processing of the Amyloid Precursor Protein\*.

- Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10485-10495.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10485>
117. Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M. P., Van Gorp, S., Nazor, K. L., Boscolo, F. S., Carson, C. T., Laurent, L. C., Marsala, M., Gage, F. H., Remes, A. M., Koo, E. H., Goldstein, L. S. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216-220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>
118. Itkin, A., Dupres, V., Dufrene, Y. F., Bechinger, B., Ruyschaert, J. M., Raussens, V. (2011). Calcium ions promote formation of amyloid beta-peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 6(3), e18250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018250>
119. Ito, E., Oka, K., Etcheberrigaray, R., Nelson, T. J., McPhie, D. L., Tofel-Greihl, B., Gibson, G. E., Alkon, D. L. (1994). Internal Ca<sup>2+</sup> mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2), 534-538. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.534>
120. Javid, B., MacAry, P. A., Lehner, P. J. (2007). Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol*, 179(4), 2035-2040. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2035>
121. Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E. (2008). Proline-directed Pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 Epitopes Induces a Compaction of the Paperclip Folding of Tau and Generates a Pathological (MC-1) Conformation\*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 32066-32076. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M805300200>
122. Jinwal, U. K., Miyata, Y., Koren, J., 3rd, Jones, J. R., Trotter, J. H., Chang, L., O'Leary, J., Morgan, D., Lee, D. C., Shults, C. L., Rousaki, A., Weeber, E. J., Zuiderweg, E. R., Gestwicki, J. E., Dickey, C. A. (2009). Chemical manipulation of hsp70 ATPase activity regulates tau stability. *J Neurosci*, 29(39), 12079-12088. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3345-09.2009>
123. Joachim, C. L., Morris, J. H., Selkoe, D. J. (1988). Clinically diagnosed Alzheimer's disease: autopsy results in 150 cases. *Ann Neurol*, 24(1), 50-56. <https://doi.org/10.1002/ana.410240110>
124. Jong, Y. J., Dalemar, L. R., Seehra, K., Baenziger, N. L. (2002). Bradykinin receptor modulation in cellular models of aging and Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol*, 2(13-14), 1833-1840. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(02\)00168-6](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(02)00168-6)
125. Kalmar, B., Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(4), 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.003>
126. Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B., Hightower, L. E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell*

- Stress Chaperones*, 14(1), 105-111. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7>
127. Karpievitch, Y. V., Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D., Dabney, A. R. (2010). Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *The annals of applied statistics*, 4(4), 1797-1823. <https://doi.org/10.1214/10-AOAS341>
128. Karring, H., Thøgersen, I. B., Klintworth, G. K., Enghild, J. J., Møller-Pedersen, T. (2004). Proteomic analysis of the soluble fraction from human corneal fibroblasts with reference to ocular transparency. *Mol Cell Proteomics*, 3(7), 660-674. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400016-MCP200>
129. Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., George-Hyslop, P. S., Tohyama, M. (2001). Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. *J Biol Chem*, 276(46), 43446-43454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104096200>
130. Katritch, V., Cherezov, V., Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 531-556. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>
131. Kawamoto, E. M., Vivar, C., Camandola, S. (2012). Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front Pharmacol*, 3, 61. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00061>
132. Kenney, D. L., Benarroch, E. E. (2015). The autophagy-lysosomal pathway: General concepts and clinical implications. *Neurology*, 85(7), 634-645. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001860>
133. Khan, T. K., Alkon, D. L. (2015). Peripheral biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 44(3), 729-744. <https://doi.org/10.3233/jad-142262>
134. Kim, M.-Y., Park, J.-H., Choi, E.-J., Park, H.-S. (2005). Presenilin acts as a positive regulator of basal level activity of ERK through the Raf-MEK1 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(2), 609-613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.001>
135. Kimura, T., Ishiguro, K., Hisanaga, S. (2014). Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front Mol Neurosci*, 7, 65. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00065>
136. King, T. D., Gandy, J. C., Bijur, G. N. (2006). The protein phosphatase-1/inhibitor-2 complex differentially regulates GSK3 dephosphorylation and increases sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 levels. *Exp Cell Res*, 312(18), 3693-3700. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.010>
137. Klapan, K., Simon, D., Karaulov, A., Gomzikova, M., Rizvanov, A., Yousefi, S., Simon, H. U. (2022). Autophagy and Skin Diseases. *Front Pharmacol*, 13, 844756. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.844756>

138. Knobloch, M., Mansuy, I. M. (2008). Dendritic Spine Loss and Synaptic Alterations in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 37(1), 73-82. <https://doi.org/10.1007/s12035-008-8018-z>
139. Koga, H., Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 43(1), 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.07.006>
140. Koren, J., 3rd, Jinwal, U. K., Lee, D. C., Jones, J. R., Shults, C. L., Johnson, A. G., Anderson, L. J., Dickey, C. A. (2009). Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, 13(4), 619-630. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00557.x>
141. Kudriaeva, A. A., Sokolov, A. V., Belogurov, A. A. J. (2020). Stochastics of Degradation: The Autophagic-Lysosomal System of the Cell. *Acta Naturae*, 12(1), 18-32. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10936>
142. Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S. J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E. R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K. L., Moreno-Grau, S., . . . Environmental Risk for Alzheimer's Disease, C. (2019). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nature genetics*, 51(3), 414-430. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>
143. Kurakin, A., Bredesen, D. E. (2020). Alzheimer's disease as a systems network disorder: chronic stress/dyshomeostasis, innate immunity, and genetics. *Aging (Albany NY)*, 12(18), 17815-17844. <https://doi.org/10.18632/aging.103883>
144. Lackie, R. E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V. G., Marques-Lopes, J., Choy, W. Y., Duennwald, M. L., Prado, V. F., Prado, M. A. M. (2017). The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci*, 11, 254. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00254>
145. LaFerla, F. M., Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006320>
146. Lane, C. A., Hardy, J., Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*, 25(1), 59-70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>
147. Lauretti, E., Dincer, O., Pratico, D. (2020). Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867(5), 118664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118664>
148. Leak, R. K. (2014). Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *J Cell Commun Signal*, 8(4), 293-310. <https://doi.org/10.1007/s12079-014-0243-9>
149. Leclerc, E., Sturchler, E., Vetter, S. W. (2010). The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2010, 539581. <https://doi.org/10.1155/2010/539581>

150. Lee, J. H., Yu, W. H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., Wolfe, D. M., Martinez-Vicente, M., Massey, A. C., Sovak, G., Uchiyama, Y., Westaway, D., Cuervo, A. M., Nixon, R. A. (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141(7), 1146-1158. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.008>
151. Lee, S., Tsai, F. T. (2005). Molecular chaperones in protein quality control. *J Biochem Mol Biol*, 38(3), 259-265. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.3.259>
152. Leinonen, V., Koivisto, A. M., Savolainen, S., Rummukainen, J., Tamminen, J. N., Tillgren, T., Vainikka, S., Pyykkö, O. T., Mölsä, J., Fraunberg, M., Pirttilä, T., Jääskeläinen, J. E., Soininen, H., Rinne, J., Alafuzoff, I. (2010). Amyloid and tau proteins in cortical brain biopsy and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 68(4), 446-453. <https://doi.org/10.1002/ana.22100>
153. Li, N., Liu, K., Qiu, Y., Ren, Z., Dai, R., Deng, Y., Qing, H. (2016). Effect of Presenilin Mutations on APP Cleavage; Insights into the Pathogenesis of FAD. *Front Aging Neurosci*, 8, 51. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00051>
154. Lindberg, I., Shorter, J., Wiseman, R. L., Chiti, F., Dickey, C. A., McLean, P. J. (2015). Chaperones in Neurodegeneration. *J Neurosci*, 35(41), 13853-13859. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2600-15.2015>
155. Liu, Y. J., Chern, Y. (2021). Contribution of Energy Dysfunction to Impaired Protein Translation in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*, 15, 668500. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.668500>
156. Liu, Z., Li, T., Li, P., Wei, N., Zhao, Z., Liang, H., Ji, X., Chen, W., Xue, M., Wei, J. (2015). The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 352723. <https://doi.org/10.1155/2015/352723>
157. Lu, R. C., Tan, M. S., Wang, H., Xie, A. M., Yu, J. T., Tan, L. (2014). Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, 2014, 435203. <https://doi.org/10.1155/2014/435203>
158. Luna-Muñoz, J., Chávez-Macías, L., García-Sierra, F., Mena, R. (2007). Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 12(4), 365-375. <https://doi.org/10.3233/jad-2007-12410>
159. Lyon, M. S., Milligan, C. (2019). Extracellular heat shock proteins in neurodegenerative diseases: New perspectives. *Neurosci Lett*, 711, 134462. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134462>
160. Ma, T., Trinh, M. A., Wexler, A. J., Bourbon, C., Gatti, E., Pierre, P., Cavener, D. R., Klann, E. (2013). Suppression of eIF2 $\alpha$  kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat Neurosci*, 16(9), 1299-1305. <https://doi.org/10.1038/nn.3486>

161. Maarouf, C. L., Daugs, I. D., Spina, S., Vidal, R., Kokjohn, T. A., Patton, R. L., Kalback, W. M., Luehrs, D. C., Walker, D. G., Castaño, E. M., Beach, T. G., Ghetti, B., Roher, A. E. (2008). Histopathological and molecular heterogeneity among individuals with dementia associated with Presenilin mutations. *Mol Neurodegener*, 3, 20. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-20>
162. Magini, A., Urbanelli, L., Ciccarone, V., Tancini, B., Polidoro, M., Timperio, A. M., Zolla, L., Tedde, A., Sorbi, S., Emiliani, C. (2010). Fibroblasts from PS1 mutated pre-symptomatic subjects and Alzheimer's disease patients share a unique protein levels profile. *J Alzheimers Dis*, 21(2), 431-444. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091522>
163. Magrané, J., Smith, R. C., Walsh, K., Querfurth, H. W. (2004). Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci*, 24(7), 1700-1706. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4330-03.2004>
164. Maiti, P., Manna, J., Veleri, S., Frautschy, S. (2014). Molecular chaperone dysfunction in neurodegenerative diseases and effects of curcumin. *Biomed Res Int*, 2014, 495091. <https://doi.org/10.1155/2014/495091>
165. Marshall, R. S., Vierstra, R. D. (2019). Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Front Mol Biosci*, 6, 40. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00040>
166. Martín-Maestro, P., Gargini, R., A, A. S., García, E., Anton, L. C., Noggle, S., Arancio, O., Avila, J., García-Escudero, V. (2017). Mitophagy Failure in Fibroblasts and iPSC-Derived Neurons of Alzheimer's Disease-Associated Presenilin 1 Mutation. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 291. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00291>
167. Martín-Maestro, P., Gargini, R., A, A. S., García, E., Antón, L. C., Noggle, S., Arancio, O., Avila, J., García-Escudero, V. (2017). Mitophagy Failure in Fibroblasts and iPSC-Derived Neurons of Alzheimer's Disease-Associated Presenilin 1 Mutation. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 291. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00291>
168. Martín-Peña, A., Rincón-Limas, D. E., Fernández-Fúnez, P. (2018). Engineered Hsp70 chaperones prevent A $\beta$ 42-induced memory impairments in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 8(1), 9915. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28341-w>
169. Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C., Terro, F. (2013). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 12(1), 289-309. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.06.003>
170. Masatoshi, T., Yoshitaka, T., Tsuyoshi, N. (1992). Change in the cytoskeletal system in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological*

- Psychiatry*, 16(3), 317-328. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0278-5846\(92\)90083-Q](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0278-5846(92)90083-Q)
171. Mateyak, M. K., Kinzy, T. G. (2010). eEF1A: thinking outside the ribosome. *J Biol Chem*, 285(28), 21209-21213. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.113795>
172. Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J. Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., Martorell, A. J., Ransohoff, R. M., Hafler, B. P., Bennett, D. A., Kellis, M., Tsai, L. H. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*, 570(7761), 332-337. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1195-2>
173. Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A., Fullgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., Licitra, F., Lopez Ramirez, A., Pavel, M., Puri, C., Renna, M., Ricketts, T., Schlotawa, L., Vicinanza, M., Won, H., . . . Rubinsztein, D. C. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*, 93(5), 1015-1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>
174. Meyuhas, O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem*, 267(21), 6321-6330. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01719.x>
175. Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., Niewiadomska, G. (2014). Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4671-4713. <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/3/4671>
176. Mirnics, K., Norstrom, E. M., Garbett, K., Choi, S. H., Zhang, X., Ebert, P., Sisodia, S. S. (2008). Molecular signatures of neurodegeneration in the cortex of PS1/PS2 double knockout mice. *Mol Neurodegener*, 3, 14. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-14>
177. Mizuno, S., Iijima, R., Ogishima, S., Kikuchi, M., Matsuoka, Y., Ghosh, S., Miyamoto, T., Miyashita, A., Kuwano, R., Tanaka, H. (2012). AlzPathway: a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol*, 6, 52. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-52>
178. Mizushima, N. (2018). A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol*, 20(5), 521-527. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0092-5>
179. Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M. C., Williams, S. (2014). Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40(2), 121-135. <https://doi.org/10.1111/nan.12084>
180. Moradifard, S., Hoseinbeyki, M., Ganji, S. M., Minucheher, Z. (2018). Analysis of microRNA and Gene Expression Profiles in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis Approach. *Sci Rep*, 8(1), 4767. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20959-0>

181. Morán Luengo, T., Mayer, M. P., Rüdiger, S. G. D. (2019). The Hsp70-Hsp90 Chaperone Cascade in Protein Folding. *Trends Cell Biol*, 29(2), 164-177. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.004>
182. Morawe, T., Hiebel, C., Kern, A., Behl, C. (2012). Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 46(1), 41-54. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8246-0>
183. Moreau, K., Ghislat, G., Hochfeld, W., Renna, M., Zavodszky, E., Runwal, G., Puri, C., Lee, S., Siddiqi, F., Menzies, F. M., Ravikumar, B., Rubinsztein, D. C. (2015). Transcriptional regulation of Annexin A2 promotes starvation-induced autophagy. *Nat Commun*, 6, 8045. <https://doi.org/10.1038/ncomms9045>
184. Moreno, C. L., Della Guardia, L., Shnyder, V., Ortiz-Virumbrales, M., Kruglikov, I., Zhang, B., Schadt, E. E., Tanzi, R. E., Noggle, S., Buettner, C., Gandy, S. (2018). iPSC-derived familial Alzheimer's PSEN2 (N141I) cholinergic neurons exhibit mutation-dependent molecular pathology corrected by insulin signaling. *Mol Neurodegener*, 13(1), 33-33. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0265-5>
185. Morozova, K., Sridhar, S., Zolla, V., Clement, C. C., Scharf, B., Verzani, Z., Diaz, A., Larocca, J. N., Hajjar, K. A., Cuervo, A. M., Santambrogio, L. (2015). Annexin A2 promotes phagophore assembly by enhancing Atg16L<sup>+</sup> vesicle biogenesis and homotypic fusion. *Nat Commun*, 6, 5856. <https://doi.org/10.1038/ncomms6856>
186. Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J., Lewczuk, P. (2018). Cellular Receptors of Amyloid beta Oligomers (AbetaOs) in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071884>
187. Muchowski, P. J., Wacker, J. L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(1), 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrn1587>
188. Mukhamedyarov, M. A., Rizvanov, A. A., Yakupov, E. Z., Zefirov, A. L., Kiyasov, A. P., Reis, H. J., Teixeira, A. L., Vieira, L. B., Lima, L. M., Salafutdinov, I. I., Petukhova, E. O., Khaiboullina, S. F., Schlauch, K. A., Lombardi, V. C., Palotás, A. (2016). Transcriptional Analysis of Blood Lymphocytes and Skin Fibroblasts, Keratinocytes, and Endothelial Cells as a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 54(4), 1373-1383. <https://doi.org/10.3233/JAD-160457>
189. Muñoz, U., Bartolomé, F., Bermejo, F., Martín-Requero, A. (2008). Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol Aging*, 29(10), 1474-1484. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.013>
190. Neely, K. M., Green, K. N., LaFerla, F. M. (2011). Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a  $\gamma$ -secretase-independent manner. *J Neurosci*, 31(8), 2781-2791. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5156-10.2010>



191. Nierzwicki, Ł., Olewniczak, M., Chodnicki, P., Czub, J. (2021). Role of cholesterol in substrate recognition by  $\gamma$ -secretase. *Scientific Reports*, 11(1), 15213. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94618-2>
192. Nieweg, K., Andreyeva, A., van Stegen, B., Tanriöver, G., Gottmann, K. (2015). Alzheimer's disease-related amyloid- $\beta$  induces synaptotoxicity in human iPSC-derived neurons. *Cell death y disease*, 6(4), e1709-e1709. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.72>
193. Nilsson, P., Loganathan, K., Sekiguchi, M., Matsuba, Y., Hui, K., Tsubuki, S., Tanaka, M., Iwata, N., Saito, T., Saido, T. C. (2013). Abeta secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Rep*, 5(1), 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.042>
194. Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 19(8), 983-997. <https://doi.org/10.1038/nm.3232>
195. Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A., Cuervo, A. M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(2), 113-122. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.2.113>
196. Ochalek, A., Mihalik, B., Avci, H. X., Chandrasekaran, A., Téglási, A., Bock, I., Giudice, M. L., Táncoş, Z., Molnár, K., László, L., Nielsen, J. E., Holst, B., Freude, K., Hyttel, P., Kobolák, J., Dinnyés, A. (2017). Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alzheimers Res Ther*, 9(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0317-z>
197. Ochalek, A., Mihalik, B., Avci, H. X., Chandrasekaran, A., Téglási, A., Bock, I., Giudice, M. L., Táncoş, Z., Molnár, K., László, L., Nielsen, J. E., Holst, B., Freude, K., Hyttel, P., Kobolák, J., Dinnyés, A. (2017). Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alzheimer's Research y Therapy*, 9(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0317-z>
198. Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., Wu, E., Dakin, K., Petzold, M., Blennow, K., Zetterberg, H. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 15(7), 673-684. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(16\)00070-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(16)00070-3)
199. OMS. (2022). *Demencia*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
200. Ortiz-Virumbrales, M., Moreno, C. L., Kruglikov, I., Marazuela, P., Sproul, A., Jacob, S., Zimmer, M., Paull, D., Zhang, B., Schadt, E. E., Ehrlich, M. E., Tanzi, R. E., Arancio, O., Noggle, S., Gandy, S. (2017). CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's

- PSEN2N141neurons. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0475-z>
201. Ou, J. R., Tan, M. S., Xie, A. M., Yu, J. T., Tan, L. (2014). Heat shock protein 90 in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int*, 2014, 796869. <https://doi.org/10.1155/2014/796869>
202. Palmqvist, S., Janelidze, S., Quiroz, Y. T., Zetterberg, H., Lopera, F., Stomrud, E., Su, Y., Chen, Y., Serrano, G. E., Leuzy, A., Mattsson-Carlgrén, N., Strandberg, O., Smith, R., Villegas, A., Sepulveda-Falla, D., Chai, X., Proctor, N. K., Beach, T. G., Blennow, K., . . . Hansson, O. (2020). Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *Jama*, 324(8), 772-781. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12134>
203. Park, J. M., Seo, M., Jung, C. H., Grunwald, D., Stone, M., Otto, N. M., Toso, E., Ahn, Y., Kyba, M., Griffin, T. J., Higgins, L., Kim, D. H. (2018). ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy*, 14(4), 584-597. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1422851>
204. Paschen, W., Mengesdorf, T. (2005). Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium*, 38(3-4), 409-415. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.019>
205. Patterson, K. R., Ward, S. M., Combs, B., Voss, K., Kanaan, N. M., Morfini, G., Brady, S. T., Gamblin, T. C., Binder, L. I. (2011). Heat shock protein 70 prevents both tau aggregation and the inhibitory effects of preexisting tau aggregates on fast axonal transport. *Biochemistry*, 50(47), 10300-10310. <https://doi.org/10.1021/bi2009147>
206. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
207. Pedrero-Prieto, C. M., Flores-Cuadrado, A., Saiz-Sánchez, D., Úbeda-Bañón, I., Frontiñán-Rubio, J., Alcaín, F. J., Mateos-Hernández, L., de la Fuente, J., Durán-Prado, M., Villar, M., Martínez-Marcos, A., Peinado, J. R. (2019). Human amyloid- $\beta$  enriched extracts: evaluation of in vitro and in vivo internalization and molecular characterization. *Alzheimers Res Ther*, 11(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0513-0>
208. Pei, J. J., Braak, H., An, W. L., Winblad, B., Cowburn, R. F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. (2002). Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 109(1-2), 45-55. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(02\)00488-6](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(02)00488-6)
209. Penke, B., Bogár, F., Crul, T., Sántha, M., Tóth, M. E., Vigh, L. (2018). Heat Shock Proteins and Autophagy Pathways in Neuroprotection: from Molecular Bases to Pharmacological Interventions. *Int J Mol Sci*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010325>

210. Penke, B., Bogár, F., Fülöp, L. (2017).  $\beta$ -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Molecules*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101692>
211. Penney, J., Ralvenius, W. T., Tsai, L. H. (2020). Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*, 25(1), 148-167. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0468-3>
212. Pérez, M. J., Ponce, D. P., Osorio-Fuentealba, C., Behrens, M. I., Quintanilla, R. A. (2017). Mitochondrial Bioenergetics Is Altered in Fibroblasts from Patients with Sporadic Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 11, 553. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00553>
213. Peterson, C., Goldman, J. E. (1986). Alterations in calcium content and biochemical processes in cultured skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(8), 2758-2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2758>
214. Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M. Y., Klein, P. S. (2003). GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides. *Nature*, 423(6938), 435-439. <https://doi.org/10.1038/nature01640>
215. Piccini, A., Fassio, A., Pasqualetto, E., Vitali, A., Borghi, R., Palmieri, D., Nacmias, B., Sorbi, S., Sitia, R., Tabaton, M. (2004). Fibroblasts from FAD-linked presenilin 1 mutations display a normal unfolded protein response but overproduce Abeta42 in response to tunicamycin. *Neurobiol Dis*, 15(2), 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.11.013>
216. Pigino, G., Morfini, G., Pelsman, A., Mattson, M. P., Brady, S. T., Busciglio, J. (2003). Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci*, 23(11), 4499-4508. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-11-04499.2003>
217. Pigino, G., Pelsman, A., Mori, H., Busciglio, J. (2001). Presenilin-1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth, and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *J Neurosci*, 21(3), 834-842. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-03-00834.2001>
218. Planel, E., Yasutake, K., Fujita, S. C., Ishiguro, K. (2001). Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J Biol Chem*, 276(36), 34298-34306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102780200>
219. Priller, C., Dewachter, I., Vassallo, N., Paluch, S., Pace, C., Kretschmar, H. A., Van Leuven, F., Herms, J. (2007). Mutant Presenilin 1 Alters Synaptic Transmission in Cultured Hippocampal Neurons \*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1119-1127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605066200>
220. Puig, K. L., Combs, C. K. (2013). Expression and function of APP and its metabolites outside the central nervous system. *Exp Gerontol*, 48(7), 608-611. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.07.009>
221. Puricelli, L., Iori, E., Million, R., Arrigoni, G., James, P., Vedovato, M., Tessari, P. (2006). Proteome Analysis of Cultured Fibroblasts from Type

- 1 Diabetic Patients and Normal Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(9), 3507-3514. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0274>
222. Qi, H., Prabakaran, S., Cantrelle, F.-X., Chambrud, B., Gunawardena, J., Lippens, G., Landrieu, I. (2016). Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase\*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7742-7753. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700914>
223. Rai, S. N., Dilnashin, H., Birla, H., Singh, S. S., Zahra, W., Rathore, A. S., Singh, B. K., Singh, S. P. (2019). The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotoxicity Research*, 35(3), 775-795. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-0003-y>
224. Rao, R. V., Bredesen, D. E. (2004). Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol*, 16(6), 653-662. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.012>
225. Reddy, K., Cusack, C. L., Nnah, I. C., Khayati, K., Saqena, C., Huynh, T. B., Noggle, S. A., Ballabio, A., Dobrowolski, R. (2016). Dysregulation of Nutrient Sensing and CLEARance in Presenilin Deficiency. *Cell reports*, 14(9), 2166-2179. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.006>
226. Reddy, P. H., Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in molecular medicine*, 14(2), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.002>
227. Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*, 29(6), 613-627. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>
228. Rivera, I., Capone, R., Cauvi, D. M., Arispe, N., De Maio, A. (2018). Modulation of Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide oligomerization and toxicity by extracellular Hsp70. *Cell Stress Chaperones*, 23(2), 269-279. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0839-0>
229. Rousseau, A., Bertolotti, A. (2018). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(11), 697-712. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0040-z>
230. Russo, C., Dolcini, V., Salis, S., Venezia, V., Zambrano, N., Russo, T., Schettini, G. (2002). Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*, 277(38), 35282-35288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110785200>
231. Saftig, P., Schröder, B., Blanz, J. (2010). Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1420-1423. <https://doi.org/10.1042/bst0381420>
232. Saido, T., Leissring, M. A. (2012). Proteolytic degradation of amyloid  $\beta$ -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(6), a006379. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006379>

233. Sakaguchi, M., Arruda-Carvalho, M., Kang, N. H., Imaizumi, Y., Poirier, F., Okano, H., Frankland, P. W. (2011). Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice. *Mol Brain*, 4, 33. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-33>
234. Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Hiltunen, M., Soininen, H. (2011). Hsp90 regulates tau pathology through co-chaperone complexes in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 93(1), 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.10.006>
235. Sanchez-Varo, R., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Torres, M., Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., De Castro, V., Jimenez, S., Ruano, D., Vizueté, M., Davila, J. C., Garcia-Verdugo, J. M., Jimenez, A. J., Vitorica, J., Gutierrez, A. (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol*, 123(1), 53-70. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0896-x>
236. Saraceno, C., Musardo, S., Marcello, E., Pelucchi, S., Di Luca, M. (2013). Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Front Pharmacol*, 4, 77. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00077>
237. Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 388(10043), 505-517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1)
238. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
239. Schwalbe, M., Kadavath, H., Biernat, J., Ozenne, V., Blackledge, M., Mandelkow, E., Zweckstetter, M. (2015). Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231. *Structure*, 23(8), 1448-1458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.002>
240. Sengupta, U., Nilson, A. N., Kaye, R. (2016). The Role of Amyloid-beta Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*, 6, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035>
241. Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M. L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., Schraen-Maschke, S., Buee, L. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics*, 5(2), 207-224. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.2.207>
242. Shelton, L. B., Koren, J., 3rd, Blair, L. J. (2017). Imbalances in the Hsp90 Chaperone Machinery: Implications for Tauopathies. *Front Neurosci*, 11, 724. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00724>
243. Shen, J., Kelleher, R. J., 3rd. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic

- mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2), 403-409.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0608332104>
244. Shepherd, C. E., Gregory, G. C., Vickers, J. C., Brooks, W. S., Kwok, J. B., Schofield, P. R., Kril, J. J., Halliday, G. M. (2004). Positional effects of presenilin-1 mutations on tau phosphorylation in cortical plaques. *Neurobiol Dis*, 15(1), 115-119.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.10.008>
245. Siman, R., Reaume, A. G., Savage, M. J., Trusko, S., Lin, Y. G., Scott, R. W., Flood, D. G. (2000). Presenilin-1 P264L knock-in mutation: differential effects on abeta production, amyloid deposition, and neuronal vulnerability. *J Neurosci*, 20(23), 8717-8726.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-23-08717.2000>
246. Simic, G., Babic Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milosevic, N., Bazadona, D., Buee, L., de Silva, R., Di Giovanni, G., Wischik, C., Hof, P. R. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/biom6010006>
247. Simón, L., Campos, A., Leyton, L., Quest, A. F. G. (2020). Caveolin-1 function at the plasma membrane and in intracellular compartments in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 39(2), 435-453.  
<https://doi.org/10.1007/s10555-020-09890-x>
248. Simonian, N. A., Coyle, J. T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 83-106.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.000503>
249. Sims, N. R., Finegan, J. M., Blass, J. P. (1985). Altered glucose metabolism in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 313(10), 638-639.  
<https://doi.org/10.1056/nejm198509053131013>
250. Singh, T. J., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1995). Modulation of GSK-3-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline-dependent protein kinases. *FEBS Lett*, 358(1), 4-8.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01383-c](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01383-c)
251. Söllvander, S., Nikitidou, E., Brolin, R., Söderberg, L., Sehlin, D., Lannfelt, L., Erlandsson, A. (2016). Accumulation of amyloid-β by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicle-induced apoptosis of neurons. *Mol Neurodegener*, 11(1), 38.  
<https://doi.org/10.1186/s13024-016-0098-z>
252. Sorbi, S., Piacentini, S., Latorraca, S., Piersanti, P., Amaducci, L. (1995). Alterations in metabolic properties in fibroblasts in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 9(2), 73-77.  
<https://doi.org/10.1097/00002093-199509020-00003>
253. Soto, P., Griffin, M. A., Shea, J.-E. (2007). New Insights into the Mechanism of Alzheimer Amyloid- $\beta$  Fibrillogenesis Inhibition by N-Methylated Peptides. *Biophysical Journal*, 93(9), 3015-3025. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112086>

254. Sproul, A. A., Jacob, S., Pre, D., Kim, S. H., Nestor, M. W., Navarro-Sobrinho, M., Santa-Maria, I., Zimmer, M., Aubry, S., Steele, J. W., Kahler, D. J., Dranovsky, A., Arancio, O., Crary, J. F., Gandy, S., Noggle, S. A. (2014). Characterization and molecular profiling of PSEN1 familial Alzheimer's disease iPSC-derived neural progenitors. *PLoS One*, 9(1), e84547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084547>
255. Starossom, S. C., Mascanfroni, I. D., Imitola, J., Cao, L., Raddassi, K., Hernandez, S. F., Bassil, R., Croci, D. O., Cerliani, J. P., Delacour, D., Wang, Y., Elyaman, W., Khoury, S. J., Rabinovich, G. A. (2012). Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity*, 37(2), 249-263. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.023>
256. Strutz, F., Okada, H., Lo, C. W., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E., Neilson, E. G. (1995). Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*, 130(2), 393-405. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.2.393>
257. Struyfs, H., Niemantsverdriet, E., Goossens, J., Franssen, E., Martin, J. J., De Deyn, P. P., Engelborghs, S. (2015). Cerebrospinal Fluid P-Tau181P: Biomarker for Improved Differential Dementia Diagnosis. *Front Neurol*, 6, 138. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00138>
258. Sun, X., Beglopoulos, V., Mattson, M. P., Shen, J. (2005). Hippocampal spatial memory impairments caused by the familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 M146V mutation. *Neurodegener Dis*, 2(1), 6-15. <https://doi.org/10.1159/000086426>
259. Sun, Y., MacRae, T. H. (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(21), 2460-2476. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5190-4>
260. Takano, M., Yamashita, T., Nagano, K., Otani, M., Maekura, K., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Tomiyama, T., Mori, H., Matsuura, K., Matsuyama, S. (2013). Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neurosci Lett*, 534, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.11.010>
261. Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S., Wolozin, B. (1998). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9637-9641. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9637>
262. Tanemura, K., Chui, D. H., Fukuda, T., Murayama, M., Park, J. M., Akagi, T., Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Kimura, T., Hashikawa, T., Nakano, Y., Kudo, T., Takeda, M., Takashima, A. (2006). Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1). *J Biol Chem*, 281(8), 5037-5041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509145200>
263. Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4)

264. Tasab, M., Batten, M. R., Bulleid, N. J. (2000). Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *The EMBO Journal*, 19(10), 2204-2211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/19.10.2204>
265. Tesco, G., Latorraca, S., Piersanti, P., Piacentini, S., Amaducci, L., Sorbi, S. (1992). Alzheimer skin fibroblasts show increased susceptibility to free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*, 66(2), 117-120. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0047-6374\(92\)90129-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0047-6374(92)90129-2)
266. Thathiah, A., De Strooper, B. (2009). G protein-coupled receptors, cholinergic dysfunction, and Abeta toxicity in Alzheimer's disease. *Sci Signal*, 2(93), re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.293re8>
267. Thathiah, A., De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 73-87. <https://doi.org/10.1038/nrn2977>
268. Toral-Rios, D., Pichardo-Rojas, P. S., Alonso-Vanegas, M., Campos-Pena, V. (2020). GSK3beta and Tau Protein in Alzheimer's Disease and Epilepsy. *Front Cell Neurosci*, 14, 19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00019>
269. Tóth, M. E., Szegedi, V., Varga, E., Juhász, G., Horváth, J., Borbély, E., Csibrány, B., Alföldi, R., Lénárt, N., Penke, B., Sántha, M. (2013). Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress Chaperones*, 18(6), 759-771. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0428-9>
270. Tretter, L., Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1464), 2335-2345. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1764>
271. Trushina, E. (2019). Alzheimer's disease mechanisms in peripheral cells: Promises and challenges. *Alzheimers Dement (N Y)*, 5, 652-660. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.06.008>
272. Tsokas, P., Grace, E. A., Chan, P., Ma, T., Sealfon, S. C., Iyengar, R., Landau, E. M., Blitzer, R. D. (2005). Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J Neurosci*, 25(24), 5833-5843. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0599-05.2005>
273. Turner, R. S., Stubbs, T., Davies, D. A., Albeni, B. C. (2020). Potential New Approaches for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Related Dementias. *Front Neurol*, 11, 496. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00496>
274. Uberti, D., Carsana, T., Bernardi, E., Rodella, L., Grigolato, P., Lanni, C., Racchi, M., Govoni, S., Memo, M. (2002). Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *J Cell Sci*, 115(Pt 15), 3131-3138. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.15.3131>



275. Veeraraghavalu, K., Choi, S. H., Zhang, X., Sisodia, S. S. (2013). Endogenous expression of FAD-linked PS1 impairs proliferation, neuronal differentiation and survival of adult hippocampal progenitors. *Mol Neurodegener*, 8, 41. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-41>
276. Venugopal, A., Sundaramoorthy, K., Vellingiri, B. (2019). Therapeutic potential of Hsp27 in neurological diseases. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 20(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s43042-019-0023-4>
277. Wakita, H., Tokura, Y., Furukawa, F., Takigawa, M. (1994). High calcium induces heat shock proteins 72 and 60 in cultured human keratinocytes: comparative study with heat shock and sunlamp light irradiation. *Journal of Dermatological Science*, 8(2), 136-144. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-1811\(94\)90008-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-1811(94)90008-6)
278. Wan, W., Cao, L., Kalionis, B., Xia, S., Tai, X. (2015). Applications of Induced Pluripotent Stem Cells in Studying the Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells Int*, 2015, 382530. <https://doi.org/10.1155/2015/382530>
279. Wang, C., Najm, R., Xu, Q., Jeong, D. E., Walker, D., Balestra, M. E., Yoon, S. Y., Yuan, H., Li, G., Miller, Z. A., Miller, B. L., Malloy, M. J., Huang, Y. (2018). Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. *Nat Med*, 24(5), 647-657. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0004-z>
280. Wang, X., Wang, L. (2020). Screening and Identification of Potential Peripheral Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease Based on Bioinformatics Analysis. *Med Sci Monit*, 26, e924263. <https://doi.org/10.12659/msm.924263>
281. Wang, Y., Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci*, 17(1), 5-21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
282. Wasik, U., Schneider, G., Mieltska-Porowska, A., Mazurkiewicz, M., Fabczak, H., Weis, S., Zabke, C., Harrington, C. R., Filipek, A., Niewiadomska, G. (2013). Calcyclin binding protein and Siah-1 interacting protein in Alzheimer's disease pathology: neuronal localization and possible function. *Neurobiol Aging*, 34(5), 1380-1388. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.007>
283. Weissmann, R., Hüttenrauch, M., Kacprowski, T., Bouter, Y., Pradier, L., Bayer, T. A., Kuss, A. W., Wirths, O. (2016). Gene Expression Profiling in the APP/PS1KI Mouse Model of Familial Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 50(2), 397-409. <https://doi.org/10.3233/jad-150745>
284. Wen, P. H., Hof, P. R., Chen, X., Gluck, K., Austin, G., Younkin, S. G., Younkin, L. H., DeGasperi, R., Gama Sosa, M. A., Robakis, N. K., Haroutunian, V., Elder, G. A. (2004). The presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant P117L impairs neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Exp Neurol*, 188(2), 224-237. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.04.002>
285. Wesseling, H., Mair, W., Kumar, M., Schlaffner, C. N., Tang, S., Beerepoot, P., Fatou, B., Guise, A. J., Cheng, L., Takeda, S., Muntel, J.,

- Rotunno, M. S., Dujardin, S., Davies, P., Kosik, K. S., Miller, B. L., Berretta, S., Hedreen, J. C., Grinberg, L. T., . . . Steen, J. A. (2020). Tau PTM Profiles Identify Patient Heterogeneity and Stages of Alzheimer's Disease. *Cell*, 183(6), 1699-1713.e1613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.029>
286. Whyte, L. S., Lau, A. A., Hemsley, K. M., Hopwood, J. J., Sargeant, T. J. (2017). Endo-lysosomal and autophagic dysfunction: a driving factor in Alzheimer's disease? *J Neurochem*, 140(5), 703-717. <https://doi.org/10.1111/jnc.13935>
287. Wilhelmus, M. M., de Waal, R. M., Verbeek, M. M. (2007). Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid-Beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*, 35(3), 203-216. <https://doi.org/10.1007/s12035-007-0029-7>
288. Wisely, E. V., Xiang, Y. K., Oddo, S. (2014). Genetic suppression of  $\beta$ 2-adrenergic receptors ameliorates tau pathology in a mouse model of tauopathies. *Hum Mol Genet*, 23(15), 4024-4034. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu116>
289. Wojsiat, J., Prandelli, C., Laskowska-Kaszub, K., Martín-Requero, A., Wojda, U. (2015). Oxidative Stress and Aberrant Cell Cycle in Alzheimer's Disease Lymphocytes: Diagnostic Prospects. *J Alzheimers Dis*, 46(2), 329-350. <https://doi.org/10.3233/jad-141977>
290. Woodruff, G., Young, J. E., Martinez, F. J., Buen, F., Gore, A., Kinaga, J., Li, Z., Yuan, S. H., Zhang, K., Goldstein, L. S. (2013). The presenilin-1  $\Delta$ E9 mutation results in reduced  $\gamma$ -secretase activity, but not total loss of PS1 function, in isogenic human stem cells. *Cell Rep*, 5(4), 974-985. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.018>
291. Wruck, W., Schröter, F., Adjaye, J. (2016). Meta-Analysis of Transcriptome Data Related to Hippocampus Biopsies and iPSC-Derived Neuronal Cells from Alzheimer's Disease Patients Reveals an Association with FOXA1 and FOXA2 Gene Regulatory Networks. *J Alzheimers Dis*, 50(4), 1065-1082. <https://doi.org/10.3233/jad-150733>
292. Wu, H., Chen, S., Ammar, A. B., Xu, J., Wu, Q., Pan, K., Zhang, J., Hong, Y. (2015). Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases. *Mol Neurobiol*, 52(3), 1284-1296. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8933-0>
293. Wu, Z., Yang, B., Liu, C., Liang, G., Eckenhoff, M. F., Liu, W., Pickup, S., Meng, Q., Tian, Y., Li, S., Wei, H. (2015). Long-term dantrolene treatment reduced intraneuronal amyloid in aged Alzheimer triple transgenic mice. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 29(3), 184-191. <https://doi.org/10.1097/wad.0000000000000075>
294. Xiao, X., Liu, H., Liu, X., Zhang, W., Zhang, S., Jiao, B. (2021). APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-evaluation According to ACMG Guidelines. *Front Aging Neurosci*, 13, 695808. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695808>
295. Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W.,

- Jiang, Y., Wang, M.-W. (2021). G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>
296. Yang, J., Li, S., He, X. B., Cheng, C., Le, W. (2016). Induced pluripotent stem cells in Alzheimer's disease: applications for disease modeling and cell-replacement therapy. *Mol Neurodegener*, 11(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0106-3>
297. Yang, J., Zhao, H., Ma, Y., Shi, G., Song, J., Tang, Y., Li, S., Li, T., Liu, N., Tang, F., Gu, J., Zhang, L., Zhang, Z., Zhang, X., Jin, Y., Le, W. (2017). Early pathogenic event of Alzheimer's disease documented in iPSCs from patients with PSEN1 mutations. *Oncotarget*, 8(5), 7900-7913. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13776>
298. Yang, R. Y., Rabinovich, G. A., Liu, F. T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*, 10, e17. <https://doi.org/10.1017/s1462399408000719>
299. Yang, T., Li, S., Xu, H., Walsh, D. M., Selkoe, D. J. (2017). Large Soluble Oligomers of Amyloid  $\beta$ -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. *J Neurosci*, 37(1), 152-163. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1698-16.2016>
300. Yim, W. W., Mizushima, N. (2020). Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov*, 6, 6. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0141-7>
301. Yu, H., Saura, C. A., Choi, S. Y., Sun, L. D., Yang, X., Handler, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Fedeles, B., Wilson, M. A., Younkin, S., Kandel, E. R., Kirkwood, A., Shen, J. (2001). APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron*, 31(5), 713-726. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00417-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00417-2)
302. Yu, W., Yu, W., Yang, Y., Lü, Y. (2021). Exploring the Key Genes and Identification of Potential Diagnosis Biomarkers in Alzheimer's Disease Using Bioinformatics Analysis. *Front Aging Neurosci*, 13, 602781. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.602781>
303. Zempel, H., Mandelkow, E. (2014). Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends in Neurosciences*, 37(12), 721-732. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.004>
304. Zhang, J., Chen, L., Liu, X., Kammertoens, T., Blankenstein, T., Qin, Z. (2013). Fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells prevent carcinoma through collagen production and encapsulation of carcinogens. *Cancer Res*, 73(9), 2770-2781. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-3022>
305. Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., Vogel, H., Steinberg, G. K., Edwards, M. S., Li, G., Duncan, J. A., 3rd, Cheshier, S. H., Shuer, L. M., Chang, E. F., Grant, G. A., Gephart, M. G., Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, 89(1), 37-53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>

306. Zhao, W. Q., Ravindranath, L., Mohamed, A. S., Zohar, O., Chen, G. H., Lyketsos, C. G., Etcheberrigaray, R., Alkon, D. L. (2002). MAP kinase signaling cascade dysfunction specific to Alzheimer's disease in fibroblasts. *Neurobiol Dis*, 11(1), 166-183. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0520>
307. Zheng, X., Wang, W., Liu, R., Huang, H., Zhang, R., Sun, L. (2012). Effect of p62 on tau hyperphosphorylation in a rat model of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, 7(17), 1304-1311. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.17.004>
308. Zhu, X., Lee, H. G., Raina, A. K., Perry, G., Smith, M. A. (2002). The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals*, 11(5), 270-281. <https://doi.org/10.1159/000067426>